

PO128745

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



**Prioritätsbescheinigung
DE 199 35 553.3
über die Einreichung einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 35 553.3

Anmeldetag: 30. Juli 1999

Anmelder/Inhaber: Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg/DE

Bezeichnung: Kombinatorische Peptidsynthese mit Hilfe eines Laserdruckers

IPC: C 07 K 17/12

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der Teile der am 30. Juli 1999 eingereichten Unterlagen dieser Patentanmeldung unabhängig von gegebenenfalls durch das Kopierverfahren bedingten Farbabweichungen.

München, den 29. Juli 2010
Deutsches Patent- und Markenamt
Die Präsidentin
Im Auftrag

Hauck



Kombinatorische Peptidsynthese mithilfe eines Laserdruckers

Das Prinzip der kombinatorischen Synthese

Ziel der vorgestellten Methode ist die kombinatorische Synthese eines Arrays von möglichst vielen, möglichst dicht gepackten Peptiden auf einem Träger. Das Prinzip der kombinatorischen Synthese wird in **Abbildung 3** schematisch dargestellt. Allen Verfahren der kombinatorischen Synthese ist dabei gemeinsam, daß mithilfe einer kleinen Zahl von unterschiedlichen Monomeren eine prinzipiell nahezu unbegrenzte Zahl von unterschiedlichen Oligomeren (= eine Molekülbibliothek) synthetisiert werden kann. Dies geschieht durch einen repetitiven Prozeß bei dem:

1. Monomere auf den Träger aufgebracht werden
2. die unterschiedlichen Monomere an den Träger gekoppelt werden (diese besitzen eine Schutzgruppe, damit nicht mehrere Moleküle hintereinander gekoppelt werden)
3. die nicht gekoppelten Monomere gewaschen werden
4. die Schutzgruppen abgespalten werden und
5. der nächste Zyklus beginnt mit dem erneuten aufbringen der Monomere auf den Träger

Je nach Anzahl der verschiedenen Monomere ergibt die kombinatorische Synthese dabei schon bei rel. kurzen Oligomeren eine astronomische Zahl der möglichen Kombinationen. Wenn beispielsweise Peptide durch die kombinatorische Kopplung von Aminosäuren hergestellt werden sollen, so gibt es $20^2 = 400$ verschiedene Dipeptide, $20^4 = 160.000$ verschiedene Tetrapeptide oder $20^6 = 64.000.000$ verschiedene Hexapeptide (**Abbildung 4**). Damit bestimmt die Packungsdichte letztendlich die Komplexität der synthetisierbaren Moleküle.

Was & Warum?

Damit kann man beispielsweise sämtliche menschlichen Genprodukte als Array von überlappenden Peptiden auf einen solchen Filter bringen (**Abbildung 23**). Synthetisiert man 15mer, die mit den Nachbarpeptiden um jeweils 10 Aminosäuren überlappen, so braucht man dafür ca 10 Millionen Peptide. Verwenden kann man diese Arrays dann z.B. für das erstellen von Epitoprofilen (**Abbildung 23x**):

1. von monoklonalen Antikörpern
2. von Seren von Patienten
 - a. von Autoimmunpatienten
 - b. von Krankheiten, die im Verdacht stehen eine Autoimmunkomponente zu haben
 - c. von Krebspatienten
 - d. aber vielleicht auch von anderen Krankheiten wie Herzinfarkt, Schlaganfall

==> die haben ja vielleicht auch einen autologen Titer gegen körpereigene Proteine
3. Eine weitere Möglichkeit, ist die Suche nach Interaktionspartnern
 - a. menschlicher Proteine untereinander
 - b. oder mit Genprodukten von Krankheitserregern, z.B. mit viralen Genprodukten
 - c. mit defekten Genprodukten verglichen mit intakten Genprodukten



Technische Kennzahlen der Methode

- Vergleich mit anderen Methoden**
- Änderungen / Verbesserungen in der Zukunft**

Technische Kennzahlen

Der bei den folgenden Versuchen verwendete Laserdrucker hat eine Auflösung der gedruckten Punkte von 600dpi (dots per inch). Das entspricht einem Durchmesser der aufgedruckten einzelnen Pixel von ca 40µm, bzw. ein solcher Laserdrucker setzt bei jedem normalen Druckvorgang pro DinA4 Seite (ca 20 x 30 cm) etwa 4500 x 7000 Punkte. Dies wiederum entspricht etwa 30 Millionen Punkte pro DinA4 Seite (Abbildung 14).

Abbildung 10b zeigt, daß diese hohe Auflösung bei einem normalen Druckvorgang nahezu fehlerfrei und reproduzierbar "geerntet" werden kann. Tatsächlich zeigt auch die stärkste Vergrößerung von Abbildung 10b keinen einzigen falsch gesetzten Pixel.

Damit müßten ca 5 Millionen dunkler Spots auf einer DinA4-Seite separat voneinander untergebracht werden können, wenn jeweils ein Pixel drumrum freigelassen wird. Dies ist aber sicherlich noch lange nicht der Endpunkt einer offensichtlich rasanten technologischen Entwicklung. Die bereits jetzt schon käuflich erwerbbar Laserdrucker mit einer Auflösung von 2.400dpi setzen etwa 500 Millionen Bildpunkte pro DinA4 Seite, womit ca 80 Millionen dunkler Spots auf einer DinA4-Seite separat voneinander untergebracht werden können.

Auch das Auslesen der Bildpunkte ist kein allzu großes Problem, da bereits jetzt handelsübliche, billige und schnelle Scanner zur Verfügung stehen, die eine Auflösung von 4800dpi oder besser erreichen.

Alle diese Geräte werden in den kommenden Jahren sicherlich kontinuierlich verbessert werden, wobei die zu erwartende Grenze der Auflösung im Bereich einer Lichtwellenlänge liegen wird. Mit der Entwicklungswelle, die zu hochauflösenden Laserdruckern und Scannern führt, surft auch die vorgestellte Methode mit, sodaß in den nächsten Jahren eine kontinuierlich verbesserte Packungsdichte der synthetisierbaren Molekülbibliotheken zu erwarten ist.

Stand der Forschung

Vergleich mit anderen gebräuchlichen Verfahren für die kombinatorische Synthese

1. Vergleich mit den lithographischen Synthesen

In den nächsten Abbildungen sind einige gebräuchliche Verfahren für die kombinatorische Synthese schematisch dargestellt. Für die lithographischen Syntheseverfahren steht dabei insbesondere der Name der Firma Affymetrix. Sie sind in Abbildung 19A und 19B dargestellt. Bei diesen Verfahren wird aufgrund der Einwirkung von Licht der Syntheseort für die aktivierten Monomere zugänglich gemacht (Abbildung 19A), oder aber es werden lichtempfindliche Schutzgruppen abgespalten (Abbildung 19B), wodurch eine lokal definierbare Kettenverlängerung ermöglicht wird.

Die zwei lithographischen Verfahren (Abbildung 19A & 19B) erreichen zwar eine bisher konkurrenzlose Auflösung der einzelnen Punkte, schaffen aber offensichtlich nicht die Effizienzen und die Qualität der bewährten Standardsynthesen für Oligonukleotide oder gar für Peptide.

Die erste Publikation von Affymetrix beschäftigte sich übrighends mit der Peptidsynthese und da ist bisher sehr wenig nachgekommen. Die allermeisten Folgepublikationen hatten die Oligonukleotidsynthese zum Thema.

Zum kleinen Teil mag das an der etwas anderen Chemie liegen, die der Einsatz von Licht labilen Schutzgruppen mit sich bringt. Diese Chemie ist sicherlich noch nicht so optimiert worden ist wie die Standard fmoc Chemie.

Es gibt dafür jedoch noch einen wichtigeren prinzipiellen Grund, der in **Abbildung 21** schematisch dargestellt wird. Bei allen Druckverfahren wird immer eine ganze Schicht von unterschiedlichen Monomeren auf den Träger aufgebracht, die dann alle zusammen einen Kopplungszyklus durchlaufen bevor wiederum die nächste Schicht von Monomeren aufgedruckt wird. Bei den in **Abbildung 19A & 19B** dargestellten lithographischen Syntheseverfahren dagegen muß jede Art von Monomer nacheinander einzeln aufgebracht, gekoppelt und überschüssige Monomere gewaschen werden. Dies bedeutet, daß für die Synthese desselben Arrays von Oligomeren, die lithographischen Synthesemethoden $N \times$ mehr Kopplungszyklen durchlaufen müssen als bei den Druckverfahren nötig (**Abbildung 19C & 19D**). Die Zahl N steht dabei für die Anzahl unterschiedlicher Monomere, d.h. für die Synthese eines Arrays von Oligopeptiden brauchen die lithographischen Synthesen $20 \times$ mehr Kopplungszyklen verglichen mit den Druckverfahren. Dadurch wird die Fehlerrate bei der Synthese natürlich enorm erhöht, bzw. die Qualität des Endproduktes wird verschlechtert.

Die momentane Standardtechnik der Peptidsynthese erlaubt dabei mehr schlecht als recht die Synthese von Peptiden mit 100 Aminosäuren Länge, was bedeutet, daß die dargestellten lithographischen Syntheseverfahren schon bei der Synthese eines Arrays von Pentapeptiden sehr große Qualitätsprobleme haben. Dies ist wahrscheinlich der Grund, warum die lithographischen Verfahren bisher nur für die Synthese von Oligonukleotidarrays verwendet wurden, da dabei nur 4 verschiedene Monomere an den Träger gekoppelt werden müssen.

Ein weiterer Nebeneffekt ist die vergleichsweise schlechte Chemikalienausbeute der lithographischen Methoden, da für jede einzelne Kopplungsreaktion der gesamte Träger gleichmäßig mit den reaktiven Monomeren bedeckt werden muß.

Übrighends haben die bisher verwendeten lithographischen Methoden ein weiteres Problem, da sie das Prinzip des konfokalen Lasermikroskops zum Auslesen ihrer Signale verwenden. Damit müssen sie alle drei Dimensionen absuchen, um das gewünschte Signal zu finden, was sehr langsam ist verglichen beispielsweise mit einem Scanner (**Abbildung 22**). Deswegen macht die langsame Auslesegeschwindigkeit diesen Systemen ab einer bestimmten Komplexitätsstufe zu schaffen.

2. Vergleich mit anderen Druckverfahren

In **Abbildung 19C und 19D** werden zwei Druckverfahren für die kombinatorische Synthese einander gegenübergestellt. Das in **Abbildung 19C** schematisch dargestellte Verfahren entspricht dabei dem hier neu vorgestellten Verfahren, während das in **Abbildung 19D** dargestellte Verfahren die diversen gebräuchlichen Druckverfahren mit Druckflüssigkeiten repräsentiert (Spotten, Tintenstrahldrucker, Siebdruck etc.).

Die folgenden Abschnitte diskutieren die Vorteile, die der Einsatz eines Laserdruckers bei der Peptidsynthese gegenüber den anderen gebräuchlichen Verfahren bringt.

Kombinatorische Synthesen, bei denen die einzelnen Monomere über und nebeneinander gespottet, oder gar mit einem Tintenstrahldrucker auf den Träger aufgebracht werden (**Abbildung 19D**) sind schon seit einigen Jahren gebräuchlich. Obwohl doch auch ein Tintenstrahldrucker eine mit den Laserdruckern durchaus vergleichbare Auflösung schafft,

kann diese Auflösung bisher aber offensichtlich nur sehr mangelhaft für die kombinatorischen Synthesen „geerntet“ werden. Der Grund dafür liegt in den einander widersprechenden Anforderungen beim bedrucken eines Trägers mit Farbe bzw. mit Monomeren für die kombinatorische Synthese (Abbildung 20).

Die Brillanz der Ausdrücke von Tintenstrahldruckern wird dadurch erreicht, daß die Diffusion der verschiedenen Farbpartikel so gering wie möglich gehalten wird. Bewirkt wird dies durch die im Vergleich zu den Monomeren enorme Größe der Farbpartikel, und dadurch, daß die aufgedruckte Tonerflüssigkeit schnell flüchtige Substanzen enthält, sodaß die Farbpartikel sehr schnell ausgefällt werden. Zusätzlich wurden spezielle, stark saugfähige Hochglanzpapiere verwendet.

Diese meist hochkompliziert aufgebauten Papiere eignen sich in der Regel nicht als Träger für eine Molekülbibliothek und auch die beiden anderen Punkte widersprechen den Anforderungen an das koppeln einer möglichst dicht gepackten Molekülbibliothek:

1. Die Monomere sind sehr viel kleiner als die aufgedruckten Farbachromophoren, alleine diese Tatsache erhöht die Diffusionsrate enorm.
2. Die aufgedruckten Monomere dürfen nicht nur nicht in leicht flüchtigen Lösungsmitteln gelöst sein, im Gegenteil es ist kaum machbar ein Lösungsmittel zu finden, daß in den angestrebten Mengen im Bereich von Nanolitern nicht zu schnell verdampft, denn damit würden sich die Konzentrationen der Kopplungspartner in unerwünschter Weise verändern, denn die Kopplungsreaktion an den Träger braucht eine gewisse Zeit.

Dies ist der Grund, warum alle bisher verwendeten Spotmethoden sobald sie in kleinere Dimensionen vordringen, fehleranfällig und teuer sind. In diesen Dimensionen besteht immer die Gefahr, daß die aufgetragenen Spots verlaufen, wegspritzen, die Monomere zu weit diffundieren oder das Lösungsmittel teilweise oder ganz verdunstet.

Verglichen damit ist das drucken mit einem Laserdrucker eine sehr robuste und fehlertolerante Methode.

Vorstellen der neuen Methode

Prinzip eines Laserdruckers

Das Neue der hier vorgestellten Methode, ist der Einsatz eines Laserdruckers, um unterschiedliche Monomere möglichst dicht gepackt auf den Träger zu bringen. Abbildung 5 erklärt die Funktionsweise eines Laserdruckers:

1. der verwendete Toner besteht aus kleinen Polystyrolkügelchen mit einem magnetischen Anteil
2. die Tonerpartikel haften aufgrund des magnetischen Anteils an einer Magnetwalze
3. eine Selenwalze wird durch das ein und ausschalten eines Lasers beschrieben, der die Selenwalze partiell entlädt (oder partiell auflädt)
4. da wo die Selenwalze definiert entladen wurde, können die Tonerpartikel aufgrund elektrischer Anziehungskräfte von der Magnetwalze auf die Selenwalze springen
5. von der Selenwalze springen die Tonerpartikel aufs Papier oder eine Kopierfolie und
6. werden durch eine heiße Walze eingeschmolzen

Kennzeichen des Laserdruckers ist also, daß trockene Tonerpartikel verwendet werden, deren Inhaltsstoffe nicht diffundieren. Die Partikel sind bei Raumtemperatur fest und werden durch eine heiße Walze (Abbildung 5, Nr. 6) nur kurz aufgeschmolzen. Dadurch werden sie dann auf dem Papier fixiert.

Moderne Laserdrucker, insbesondere Farblaserdrucker, erreichen dabei eine Brillanz des Ausdrucks, die fast schon an Fotoqualität heranreicht. Diese Brillanz reflektiert eine

extrem geringe Fehlerrate beim Übertragen der Tonerpartikel auf die Selenwalze. Eine Erklärung dafür liefern die zugrundeliegenden physikalischen Kräfte: Elektrostatische Anziehung oder Abstoßung sind, zumindest in diesen Dimensionen, die stärksten bekannten Kräfte in der Physik.

Träger für die Peptidbibliothek

Zunächst wird ein Träger benötigt, an den die aktivierten Aminosäuren gekoppelt werden können. Ein solcher Träger ist bereits bekannt: Ronald Frank hat am GBF in Braunschweig eine Methode zur Derivatisierung von ganz normalem Papier mit freien Aminogruppen entwickelt (Abbildung 6), an das dann fmoc geschützte Aminosäuren mit der für die Peptidsynthese üblicherweise verwendeten Standardchemie gekoppelt werden können (Tetrahedron Letters (1990) 31(12) pp1701).

Diese Methode wird als "SPOT Synthese von Peptiden" von mehreren Firmen kommerziell genutzt (u.a. von Jerini Biotools in Berlin).

Die von Ronald Frank entwickelte Methode ermöglicht außerdem eine sehr einfache Kontrolle, ob denn eine Kopplung der aufgetragenen Aminosäuren an den Träger stattgefunden hat. Dazu weist man die nach der Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe neu entstandenen freien Aminogruppen mit Bromphenolblau nach, das nicht kovalent an diese bindet (Abbildung 7).

Zunächst wird das Papier wie in Abbildung 6 beschrieben mit einer Schicht N-terminal geschützter Aminosäuren derivatisiert und anschließend die N-terminalen fmoc Schutzgruppen abgespalten. Dabei entstehen die in der Abbildung 7A grün eingefärbten zunächst freien Aminogruppen. Daran wird anschließend eine zweite Schicht fmoc geschützter Aminosäuren gekoppelt. Vor der Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppen werden diesmal die nicht abgereagierten freien Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid verestert (rot eingefärbt in Abbildung 7A), so daß nach der Abspaltung der Schutzgruppen nur die freien Aminogruppen nachweisbar sind, wo es vorher zu einer Kopplung an den Träger gekommen ist. In Abbildung 7B sind dies die intensiv blau gefärbten Bereiche, wo die zweite Schicht von Aminosäuren an den Träger gekoppelt wurde. In den helleren Bereichen sind dagegen die freien Aminogruppen, die der ersten Schicht von Aminosäuren entstammen, mit Essigsäureanhydrid verestert worden.

Herstellung eines "Aminosäurentoners"

In einem "Aminosäurentoner" werden mit einer Schutzgruppe versehene Aminosäuren in bei Raumtemperatur feste Partikel eingebunden. Das Ziel ist dabei, daß diese Partikel dann nach dem oben beschriebenen Prinzip des Laserdruckers definiert auf einen Träger gedruckt werden können. Um dies zu erreichen, müssen die Partikel im Laserdrucker von Walze zu Walze springen können (siehe Abbildung 5), d.h. sie sollten elektrisch aufladbar sein.

Für die kombinatorische Peptidsynthese müssen darüber hinaus die darin befindlichen Aminosäuren aus dem festen Matrixmaterial heraus "beweglich gemacht" werden können, denn nur dann können sie an einen Träger koppeln. Diese Kriterien werden von dem in Abbildung 8 gezeigten "Aminosäurentonerpartikel" erfüllt:

1. das Äquivalent der bei Raumtemperatur festen Polystyrolkugeln des normalen Toners ist dabei Diphenylformamid mit einem Schmelzpunkt bei etwa 71°C.
2. der magnetische Anteil wird in beiden Fällen von Magnetitpartikeln beigesteuert.

3. anstelle der Chromophoren enthält der "Aminosäurentoner" die mit einer N-terminalen Schutzgruppe versehenen aktivierten Aminosäuren.

Das Kriterium für die Auswahl von Diphenylformamid als bei Raumtemperatur "festes Lösungsmittel" ist seine Strukturähnlichkeit mit Dimethylformamid, das für die Standardpeptidsynthese verwendet wird. Abgesehen von den unterschiedlichen Aggregatzuständen bei Raumtemperatur sind damit keine großen Unterschiede im chemischen Verhalten zu erwarten.

Genau wie der normale Toner kann auch der "Aminosäurentoner" mittels einer heißen Walze fixiert werden, wobei die für die Standardsynthese verwendeten fmoc Aminosäuren kurzfristig ohne weiteres 150°C aushalten. Statt durch Hitze können die darin enthaltenen N-terminal geschützten Aminosäuren aber auch bei Raumtemperatur mithilfe eines Lösungsmittels wie Dichlormethan "beweglich gemacht" werden, also an den derivatisierten Träger koppeln. Dies kann sogar durch die Zufuhr von Dichlormethan-Dampf geschehen.

Sowohl Diphenylformamid, wie auch Magnetit stören die Kopplung der fmoc Aminosäuren an den Träger nicht (Abbildung 9 und 11). In Abbildung 9 wurden dabei die fmoc-Aminosäuren in DPF gelöst und aufgespottet, während in Abbildung 11 ein "Aminosäurentoner" aufgedruckt und anschließend die darin enthaltenen N-terminal geschützten Aminosäuren an den Träger gekoppelt wurden.

Aus den Bestandteilen des "Aminosäurentoners" (Magnetit, Diphenylformamid und die jeweiligen mit fmoc-Schutzgruppen versehenen Aminosäuren) müssen kleine, möglichst uniforme (ca 5µm große) Partikel hergestellt werden, da der Transfer der Partikel von der Magnetwalze zur Selenwalze im wesentlichen durch das Verhältnis von Ladung zu Masse bestimmt wird. Alle hier gezeigten "Aminosäurentoner" wurden dabei mithilfe einer Kaffemühle hergestellt, in einen Tonerbehälter gefüllt und anschließend in einem Laserdrucker auf Papier gedruckt.

Ein Vergleich der Druckqualität des normalen käuflichen Toners mit den verschiedenen "Aminosäurentonern" ergibt für den normalen Toner eine Auflösung von ca 40µm (Abbildung 10b), während bei den getesteten, verglichen mit dem Stand der Technik sehr primitiv hergestellten "Aminosäurentonern", die aufgedruckten Strukturen ab einer Größe von ca 120 - 200µm klar voneinander unterscheidbar sind (Abbildung 10).

Koppeln von aufgedruckten fmoc Aminosäuren

Abbildung 11B zeigt, daß die mit einem Laserdrucker aufgedruckten Aminosäuren an den Träger koppeln können. Zunächst wird das Papier dafür mit freien Aminogruppen derivatisiert, wie oben beschrieben. Dabei entstehen die in Abbildung 11A grün dargestellten, zunächst freien Aminogruppen. Anschließend wird der "Aminosäurentoner" aufgedruckt und die darin enthaltenen fmoc geschützten Aminosäuren an die in Abbildung 11A grün dargestellten freien Aminogruppen gekoppelt. Die nicht gekoppelten fmoc Aminosäuren werden gewaschen und die übriggebliebenen freien Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid verestert (in Abbildung 11A rot dargestellt). Anschließend werden die fmoc Schutzgruppen der aufgespotteten zweiten Schicht abgespalten und die dabei neu entstehenden freien Aminogruppen mit Bromphenolblau nachgewiesen. Das entstehende blaue Muster reflektiert diesmal die Orte, an denen die zweite Schicht von Aminosäuren aufgedruckt wurde.

Voraktivierte fmoc Aminosäuren

Vorzuziehen sind dabei voraktivierte fmoc-geschützte Aminosäuren, da sie im Vergleich zu normalen fmoc-geschützten Aminosäuren mit freiem Carboxyterminus bessere Kopplungseffizienzen ergeben. Abbildung 18 zeigt schematisch den Grund dafür: Aminosäuren mit freiem Carboxyterminus werden auf den Träger aufgedruckt und müssen danach durch einen Aktivator und eine Base aktiviert werden. Dabei entsteht ein reaktiver Ester (Abbildung 6, Nr.2), der anschließend mit den freien Aminogruppen des Trägers abreagiert.

Liegt der Aktivator allerdings im Überschuß vor, so gibt es darüberhinaus noch eine unerwünschte Nebenreaktion: Der Aktivator koppelt außerdem direkt an die zur Verfügung stehenden freien Aminogruppen des Trägers, wobei die Zahl der zur Verfügung stehenden freien Aminogruppen bei jedem Syntheszyklus abnimmt (Abbildung 18).

Im Unterschied zur Standardpeptidsynthese ist es sehr schwer möglich die Molaritäten der auf den Träger aufgetragenen fmoc Aminosäuren, des Aktivators und der Base exakt auszuregulieren, sodaß sich zur Lösung des Problems das Drucken von voraktivierten N-terminal geschützten Aminosäuren anbietet.

Anstelle der fmoc Aminosäuren können z.B. die entsprechenden Anhydride verwendet werden, diese sind allerdings etwa 5x teurer verglichen mit den normalen fmoc geschützten Aminosäuren. Daß dieser Weg prinzipiell funktioniert zeigt die Abbildung 11: Dort wurde ein Anhydrid von fmoc-Alanin auf den Träger gedruckt und gekoppelt. Daß diese Kopplung erfolgreich war zeigt sich dabei an der deutlichen Blaufärbung des gedruckten Musters (Abbildung 11).

Synthese eines Peptids mithilfe von aufgedruckten fmoc Aminosäuren (Beweis des Prinzips)

Im nächsten Versuch werden schachbrettartig zwei verschiedene Peptide auf einem Träger aus derivatisiertem Papier synthetisiert (Abbildung 12). Dabei werden zunächst wie oben beschrieben die den in Abbildung 12 farbig dargestellten Aminosäuren entsprechenden "Aminosäurentoner" hergestellt (siehe auch Abbildung 10). Die in Abbildung 12 mit einem farbigen Kreis markierten Aminosäuren werden in einem regelmäßigen Muster von Ovalen aufgedruckt, während die mit einem farbigen Rechteck markierten Aminosäuren als zweites Muster aus regelmäßig angeordneten Rechtecken gedruckt werden. Beide Muster greifen dabei schachbrettartig ineinander.

Die eckigen SPOTs entsprechen dabei dem Peptid *N-Terminus* DYKDDDDK.... *C-Terminus*, das von dem Maus monoklonalen Antikörper anti FLAG M1 Calcium abhängig (1mM CaCl₂) erkannt wird, während die runden SPOTs dem Peptid *N-Terminus* DDEETTDK.... *C-Terminus* entsprechen. Einige Streifen mit den schachbrettartig angeordneten Peptiden werden mit Milchpulver inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren und anschließend mit dem Maus monoklonalen Antikörper anti FLAG M1 und zur Kontrolle mit einem Aktin spezifischen monoklonalen Antikörper gefärbt.

In Abbildung 13B ist besonders auf der Vorderseite des derivatisierten Papiers ein graues Muster zu erkennen, das von den aufgedruckten Magnetitpartikeln herrührt, die nicht vollständig gewaschen werden konnten. Dabei sind die aufgedruckten Ovale bzw. Rechtecke deutlich zu erkennen, die zu den Orten der oben beschriebenen Peptidsynthese korrespondieren.

In Abbildung 13B ist eine deutliche spezifische Reaktion des anti FLAG M1 Antikörpers zu sehen, die den rechteckigen Syntheseorten des FLAG-Peptids *N-Terminus* DDEETTDK.... *C-Terminus* entspricht. Ein Kontrollantikörper färbt diese Peptide nicht.

Dies zeigt, daß die kombinatorische Peptidsynthese mithilfe eines Laserdruckers prinzipiell möglich ist und das die dazu benötigten "Aminosäurentoner" herstellbar sind. Die in den "Aminosäurentonern" enthaltenen fmoc geschützten Aminosäuren können nach dem drucken offensichtlich auch noch an den Träger koppeln. Das 5-fache übereinanderdrucken der Aminosäurentoner war dabei hinreichend genau, um eine deutliche spezifische Färbung auch der kleineren Rechtecke zu gewährleisten, wodurch mithilfe dieser Technik mit diesen Hilfsmitteln etwa 10.000 Peptide pro DinA4 Seite synthetisiert werden können.

Bau eines Prototypen

Um das gerade beschriebene enorme Potential eines Laserdruckers für die kombinatorische Sybthese auch tatsächlich ernten zu können, muß zunächst die Qualität der "Aminosäurentoner" verbessert werden. Die bisher ziemlich primitiv mit einer Kaffeemühle hergestellten "Aminosäurentoner" schaffen derzeit eine Auflösung von ca 200-300µm, d.h. einzelne SPOTS mit etwa 300µm Abstand sind nach einem Druckvorgang deutlich voneinander zu unterscheiden (Abbildung 10). Hochgerechnet bedeutet dies, daß auf einer DinA4 Seite mit der vorgestellten Methode ca 300.000 SPOTS untergebracht werden könnten.

Für eine erfolgreiche kombinatorische Peptidsynthese in dieser Größenordnung muß jedoch noch eine weitere Voraussetzung erfüllt sein: Mehrere Lagen von "Aminosäurentonern" müssen möglichst exakt übereinander gedruckt werden können.

Genaueres Übereinanderdrucken

Die in Abbildung 13 gezeigte Peptidsynthese wurde mit einem normalen schwarz-weiß Laserdrucker durchgeführt, der das Papier auf etwa 1mm genau einzieht. Diese Genauigkeit des Papiereinzugs ermöglicht damit nur die Synthese von etwa 10.000 Peptiden pro DinA4 Seite. Das möglichst genaue Übereinanderdrucken verschiedener Schichten von fmoc-Aminosäuren ist also neben der Optimierung der "Aminosäurentoner" eine weitere Grundvoraussetzung für das „ernten“ der immensen Zahl von Bildpunkten, die ein Laserdrucker setzt.

Im folgenden sollen 2 Wege aufgezeigt werden, mit denen das genaue Übereinanderdrucken mehrerer Tonschichten erreicht wird. Kernstück beider Wege ist der Einsatz eines Farblasersdruckers (Abbildung 15).

Die meisten Farblasersdrucker verwenden die in Abbildung 15 gezeigte Lösung, um ihre vier verschiedenen Farben exakt nebeneinander zu setzen. Sie benützen zwei große Walzen, die mechanisch exakt miteinander gekoppelt sind. Auf die eine Walze schreibt der Laser das elektrostatische Bild der ersten Farbe, dann springen auf die vom Laser bestrichenen Teile die Farbpartikel von einer Magnetwalze über und werden auf das Papier, das auf der zweiten „Trägerwalze“ fest fixiert ist übertragen. Dort werden diese Farbteilchen fixiert, während der Laser das elektrostatische Bild der zweiten, danach der dritten und der vierten Farbe schreibt. Da das Papier die ganze Zeit über auf der „Trägerwalze“ fixiert wird, stimmt die räumliche Zuordnung der Farben zueinander ganz exakt (<1µm Abweichung). Erst wenn die letzte Tonschicht auf das Papier übertragen wurde, wird die Fixierung an die „Trägerwalze“ gelöst.

Dieses Verfahren gewährleistet, daß unterschiedliche Tonerpartikel räumlich exakt nebeneinander, oder im Falle von Mischfarben auch übereinander gedruckt werden. Es kann rel. einfach auch auf 20 oder mehr verschiedene Tonerpartikel ausgedehnt werden.

Dazu muß nur die Wechseltrommel, die im Farblaserdrucker die 4 verschiedenen Farbtöne mit den jeweiligen Magnetwalzen an die Selenwalze heranführt, durch eine Wechseltrommel mit 20 oder mehr unterschiedlichen Tonerbehältnissen ausgetauscht werden.

Dies würde es ermöglichen, ganz analog zur Funktionsweise des Farblaserdruckers beim Farbdruck, eine Schicht mit allen 20 unterschiedlichen Aminosäuren räumlich exakt auf den Träger aufzubringen. Wird die Fixierung des derivatisierten Papiers (oder eines anderen Trägers für die Peptidbibliothek) an die „Trägerwalze“ allerdings danach gelöst, so geht die genaue Ortsinformation verloren, da diese in der Kopplung der „Trägerwalze“ mit der Selenwalze (und damit mit der Position des Lasers) begründet ist.

Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen besteht darin, die Fixierung des Trägers an die „Trägerwalze“ während der gesamten Peptidsynthese aufrecht zu erhalten. Das bedeutet, daß alle Syntheszyklen inklusive aller Waschschriffe und dem Zuführen diverser Kopplungsreagentien auf der „Trägerwalze“ stattfinden müssen.

Abbildung 15b zeigt damit schematisch eine Art Peptid-Synthesizer, mit einem Farblaserdrucker als Herzstück. Im Unterschied zu einem normalen Farblaserdrucker (Abbildung 15) ist in Abbildung 15b die heiße Walze (Nr.6) durch eine Vorrichtung ersetzt worden, die es ermöglicht Kopplungsreagentien oder Waschlösungen in gasförmigem oder in flüssigem Zustand in Kontakt mit der sich drehenden „Trägerwalze“ zu bringen. Gasförmige Substanzen werden mithilfe einer breiten Düse zugeführt (nicht dargestellt), während Flüssigkeiten durch ein Endlosband in Kontakt mit dem auf der „Trägerwalze“ fixierten Träger der Molekülbibliothek gebracht werden.

Der zweite Weg, der zum genauen Übereinanderdrucken mehrerer Tonschichten führt, ist in Abbildung 16 dargestellt. Bei diesem Weg wird die Peptidsynthese nicht direkt auf der „Trägerwalze“ durchgeführt, stattdessen wird der Part des Farblaserdruckers auf das Drucken der „Aminosäuretoner“ beschränkt. Synthese und Waschszyklen für die Peptidsynthese finden außerhalb des Farblaserdruckers statt.

Um die einzelnen Tonschichten trotzdem exakt übereinandersetzen zu können, bedarf es bei diesem Weg einer Rückkopplung, wobei ein auf den Träger aufgebrachtes Muster von einer Scannereinheit abgerastert wird, die eine eventuelle Abweichung (auch Verzerrungen innerhalb des Trägers) erkennt und elektronisch korrigiert. Diese elektronische Korrektur kommt ohne mechanische Teile aus, da jedem abgespeicherten Bildpunkt einfach ein Vektor zugeordnet werden kann, der den Laser und damit auch den entsprechenden Tonerpartikel genau um den Korrekturbetrag dieses Vektors verschiebt.

Eine Kombination dieses zweiten Wegs mit dem ersten Weg bietet sich insbesondere dann an, wenn besonders dicht gepackte Peptidbibliotheken synthetisiert werden sollen, oder wenn eine „on-line“ Qualitätskontrolle der einzelnen Syntheseschichten gebraucht wird. In diesem Fall könnte mithilfe der Scannereinheit SPOT für SPOT und Schicht für Schicht die Intensität der Blaufärbung durch Bromphenolblau überprüft werden und damit nach jedem einzelnen Syntheseschritt die Menge an neu entstandenen freien Aminogruppen nach der Abspaltung der fmoc Schutzgruppen. Anstelle der Blaufärbung mit Bromphenolblau kann natürlich auch die charakteristische Absorption der fmoc Schutzgruppe nachgewiesen werden.

Andere Träger für die Molekülbibliothek

Um die große Zahl an möglichen Bildpunkten (= letztendlich an unterschiedlichen Peptiden) ernten zu können, muß eine weitere Voraussetzung erfüllt sein. Die Trägerfolie sollte sich möglichst wenig in sich verziehen. Nicht alle Papiersorten sind dabei die erste Wahl, Papier kann jedoch auch durch Kopierfolien ersetzt werden. Diese bestehen aus Polystyrol, das wiederum das Standardträgermaterial in der klassischen Peptidsynthese ist.

Ein weiterer Vorteil der Polystyrolfolien ist ihre Durchsichtigkeit, die bei vielen Nachweissystemen von Vorteil ist.

Anwendungsbeispiele

Die vorgestellte Methode ermöglicht eine Vielzahl von Anwendungen auch in der kombinatorische Chemie oder in der Synthese von Oligonukleotiden. Die folgenden drei Beispiele beschränken sich jedoch auf die Synthese von Peptiden. Diese Beispiele basieren insbesondere auf dem in Abbildung 15b aufgezeigten Weg, mit dem es möglich ist Arrays mit Millionen von Peptiden kostengünstig herzustellen. Alle drei Beispiele beschreiben wenige, standardisierte Produkte, für die es eine Vielzahl von möglichen Anwendungen gibt.

Drei Beispiele für die Anwendung von Peptidarrays

1. Synthese von Unigeneproduct Filtern

Der Mensch besitzt ca. 100.000 Gene, die durchschnittlich etwas weniger als 500 Aminosäuren codieren. In wenigen Jahren werden über 90% dieser Gene bekannt sein. Wenn man jedes dieser Genprodukte durch durchschnittlich 100 überlappende 15er Peptide abdeckt, die jeweils um 5 AS gegeneinander verschoben sind, so werden ca. 10 Millionen verschiedene Peptide benötigt, um alle menschlichen Genprodukte abzudecken. In Abbildung 23 ist ein solcher Filter schematisch dargestellt. Als Zwischenziele bieten sich dabei Expressionsarrays an, die jeweils nur einen Teil der menschlichen Genprodukte abdecken, z.B. „Onkogenarrays“, „Immunologiearrays“ etc.

Diese Filter sind der Ausgangspunkt für eine Vielzahl von Versuchen (Abbildung 23x):

1. Epitopbestimmung von monoklonalen Antikörpern
2. Analyse des Serums von Autoimmunpatienten (z.B. bei Rheuma)
==> welche Epitope werden erkannt?
3. Analyse des Serums von Patienten, die Krankheiten mit bisher unbekannten Ursachen haben
==> sind z.B. Multiple Sklerose oder Parkinson Autoimmunkrankheiten?
4. Analyse des Serums von Krebspatienten
==> welche Epitope werden erkannt?
(wahrscheinlich haben Krebspatienten einen Titer gegen körpereigene Antigene)
5. Suche nach Interaktionspartnern
==> an welche Peptide binden diverse HIV Genprodukte?

2. Synthese einer vollständigen Tetra oder Pentapeptidbibliothek mit dem Endziel einer vollständigen Hexapeptidbibliothek

Die Reaktion von im Blutserum befindlichen Antikörpern mit Antigen wird schon seit sehr vielen Jahren für die Diagnose von Krankheiten genutzt. Ein großer Teil des Repertoires von geschätzt $>10^8$ verschiedenen Antikörpern, über die der Mensch verfügt, kann dabei auch an kleine Penta oder Hexapeptide binden, sodaß durch die Bindung an eine vollständige Penta- oder Hexapeptidbibliothek (Abbildung 24) das Vorhandensein von sehr vielen unterschiedlichen Antikörpern im Blutserum gleichzeitig nachgewiesen werden kann.

Unterschiedliche Gruppen von Antikörpern reflektieren dabei die Immunantwort eines Patienten gegen unterschiedliche Krankheitserreger oder Krankheitszustände wie Autoimmunkrankheiten, Allergien, vielleicht auch von Erkrankungen wie Schlaganfall oder Herzinfarkt. Darüber hinaus korrelieren offensichtlich auch Krebserkrankungen mit dem Auftreten spezifischer Antikörper im Blutserum von Patienten (siehe v.a. die Arbeiten der Gruppe von Prof. Pfreundschuh aus Homburg an der Saar).

Wie schon beim ersten Beispiel ist die Zielsetzung in diesem Fall das Erkennen von Teilmustern von Bindungsereignissen, die mit Krankheitsbildern korrelieren (Abbildung 25x). Einmal identifizierte Teilmuster wiederum ermöglichen die parallele Diagnose (oder den Ausschuß) von sehr vielen unterschiedlichen Erkrankungen.

Je größer die Komplexität der Peptidbibliothek, desto sicherer können dabei dem Patientenserum reproduzierbar ein Muster von Peptid-spezifischen Antikörperreaktivitäten zugeordnet werden. Einander ähnliche Teilmuster reflektieren dabei eine ähnliche (Krankheits-) Vorgeschichte. Somit eignet sich dieses Verfahren für das Auffinden diagnostischer Marker, die wiederum für die parallele Diagnose vieler unterschiedlicher Krankheiten mithilfe eines einzigen standardisierten Produktes benutzt werden können.

Richtig spannend wirds, wenn man ein Muster von Bindungsereignissen mit Krankheiten korreliert, von denen man bisher nicht weiß, was ihre Ursache ist, denn dies ermöglicht Rückschlüsse auf die Ursache (oder bisher unbekannte Begleitumstände) der Krankheit. Kandidaten für eine solche Vorgehensweise sind z.B. Alzheimer, Parkinson, Multiple Sklerose, Herzinfarkt, Schlaganfall und viele mehr.

Getestet werden kann dieses Prinzip mit dem Serum von Patienten mit Magengeschwüren. Dabei sollten Peptide erkannt werden, die ihre Entsprechung im Genom von *Helicobacter pylori* finden (Abbildung 25).

3. Synthese von D-Peptid-Filtern

Im dritten Beispiel wird durch die oben beschriebene Technik eine beschleunigte Suche nach Leitstrukturen für die Therapie ermöglicht. Wie im zweiten Beispiel beschrieben, werden Arrays von vollständigen Peptidbibliotheken synthetisiert, die diesmal jedoch nicht aus den natürlicherweise vorkommenden L-Aminosäuren, sondern aus ihren Spiegelbildern, den D-Aminosäuren, synthetisiert werden. D-Peptide eignen sich als potentielle Therapeutika, da uns Menschen die abbauenden Enzyme dafür fehlen.

In Abbildung 26 wird ein solcher Array von D-Peptiden mit einer Protease gefärbt, die mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen wird (blaue Färbung). Dadurch können Bindungsmodule identifiziert werden, die die Fähigkeit besitzen diese Protease spezifisch zu binden.

Steht ein Enzymnachweis für die Aktivität dieser Protease zur Verfügung, so kann die Peptid gebundene Protease auch damit nachgewiesen werden. Finden sich jetzt bei einem Vergleich der beiden Färbemuster Peptide, die das Enzym zwar binden, aber gleichzeitig seine Aktivität blockieren, so hat man mit diesen die Bausteine für ein potenticles Therapeutikum in der Hand.

Beschreibung der Abbildungen

Abbildung 3

Kombinatorische Synthese:

- Monomere werden auf den Träger aufgebracht
- die unterschiedlichen Monomere werden an den Träger gekoppelt
- die nicht gekoppelten Monomere werden gewaschen
- die Schutzgruppen werden abgespalten
- erneut werden Monomere auf den Träger aufgebracht und der nächste Zyklus beginnt.

Abbildung 4

Komplexität kombinatorischer Peptidbibliotheken

Abbildung 5

Funktionsweise eines Laserdruckers:

- 1: Tonerpartikel bestehen aus kleinen Polystyrolkugeln mit einem magnetischen Anteil
- 2: die Tonerpartikel haften aufgrund des magnetischen Anteils an einer Magnetwalze
- 3: ein Laser entlädt partiell die Selenwalze (durch ein und ausschalten)
- 4: aufgrund elektrischer Anziehungskräfte springen die Tonerpartikel von der Magnetwalze auf die Selenwalze
- 5: von der Selenwalze springen die Tonerpartikel aufs Papier oder eine Kopierfolie und
- 6: werden durch eine heiße Walze eingeschmolzen

Abbildung 6

Mit Aminogruppen derivatisiertes Papier:

Die Carboxylgruppe von N-terminal geschützten Aminosäuren wird aktiviert und koppelt daraufhin an die freien Hydroxylgruppen von Papier. Nach der Abspaltung der fmoc Schutzgruppe entstehen auf dem Papier freie Aminogruppen, die durch die nicht kovalente Bindung an Bromphenolblau nachgewiesen werden können.

Abbildung 7

SPOT Synthese:

Papier wird mit einer ersten Schicht von fmoc geschützten Aminosäuren derivatisiert, nicht gekoppelte fmoc Aminosäuren gewaschen, und die fmoc Schutzgruppen der ersten Schicht mit Base abgespalten.

Eine zweite Schicht von fmoc geschützten Aminosäuren wird an definierten Orten aufgespottet, wiederum die nicht gekoppelten fmoc Aminosäuren gewaschen und die übriggebliebenen freien Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid verestert.

Anschließend werden die fmoc Schutzgruppen der aufgespotteten zweiten Schicht abgespalten und die dabei entstehenden freien Aminogruppen mit Bromphenolblau nachgewiesen.

Das entstehende blaue Muster reflektiert die Orte, an denen die zweite Schicht von Aminosäuren aufgespottet wurde (Abbildung 7B).

Abbildung 8

Schematischer Vergleich der Partikel eines normalen Toners mit einem "Aminosäurentoner":

- das Äquivalent der bei Raumtemperatur festen Polystyrolkugeln des normalen Toners ist Diphenylformamid mit einem Schmelzpunkt bei etwa 71°C.
- der magnetische Anteil wird in beiden Fällen von Magnetitpartikeln beigesteuert.
- anstelle der Chromophoren enthält der "Aminosäurentoner" die mit einer N-terminalen Schutzgruppe versehenen aktivierten Aminosäuren.

Abbildung 9

Die Kopplung an den Träger funktioniert in Anwesenheit von Diphenylformamid (DPF) genau so gut wie in Anwesenheit von 1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP): Aminosäuren mit N-terminaler fmoc Schutzgruppe werden in DPF bzw. in NMP gelöst und auf derivatisiertes Papier gespottet. Anschließend wird der in NMP gelöste Aktivator HBTU (1-H-Benzotriazole-1-yl 1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) darübergespottet und die Reaktion durch Zugabe von drei verschiedenen Basen gestartet. Nach 30 Minuten bei 65°C werden die nicht gekoppelten Aminosäuren gewaschen und übrig gebliebene freie Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid verestert. Die nach der Abspaltung der fmoc Schutzgruppe neu entstandenen freien Aminogruppen werden mit Bromphenolblau nachgewiesen.

Abbildung 10

Vergleich der Druckqualität von normalem käullichem Toner mit verschiedenen "Aminosäurentonern":

Die verschiedenen Toner wurden in eine Tonerkassette gefüllt und mit einem Laserdrucker auf normales Papier gedruckt. Die Färbung der "Aminosäurentoner" kommt durch die darin enthaltenen Magnetitpartikel zustande.

Abbildung 10b

Handelsübliche Laserdrucker haben eine Auflösung von 600dpi, d.h. die einzelnen Punkte, die diese Geräte drucken, haben einen Durchmesser von ca. 40µm. Handelsübliche Scanner mit 4.800dpi rastern das Objekt mit ca. 5µm großen Schritten ab. Das Abrastern des eingescannten Laserdruckbildes bei hoher Vergrößerung zeigt typischerweise keinen einzigen falsch gesetzten Pixel.

Abbildung 11

Papier wird mit einer ersten Schicht von fmoc geschützten Aminosäuren derivatisiert, nicht gekoppelte fmoc Aminosäuren gewaschen, und die fmoc Schutzgruppen der ersten Schicht mit Base abgespalten. Dabei entstehen die in Abbildung 11A grün dargestellten freien Aminogruppen.

Eine zweite Schicht von fmoc geschützten Aminosäuren wird an definierten Orten aufgedruckt und koppelt an die grün dargestellten freien Aminogruppen. Anschließend werden wiederum die nicht gekoppelten fmoc Aminosäuren gewaschen und die übriggebliebenen freien Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid verestert. Danach werden die fmoc Schutzgruppen der aufgedruckten zweiten Schicht abgespalten und die dabei neu entstehenden freien Aminogruppen mit Bromphenolblau nachgewiesen. Das entstehende blaue Muster reflektiert die Orte, an denen die zweite Schicht von Aminosäuren aufgedruckt wurde.

Abbildung 12

An die freien Aminogruppen von derivatisiertem Papier wird uniform nacheinander Lysin gefolgt von Asparaginsäure gekoppelt. Anschließend werden schachbrettartig zwei verschiedene Peptide auf einem Träger aus derivatisiertem Papier synthetisiert. Dabei werden wie oben beschrieben die den in Abbildung 12 farbig dargestellten Aminosäuren entsprechenden "Aminosäurentoner" hergestellt. Die in Abbildung 12 mit einem farbigen Kreis markierten Aminosäuren werden in einem regelmäßigen Muster von Ovalen aufgedruckt, während die mit einem farbigen Rechteck markierten Aminosäuren als zweites Muster aus regelmäßig angeordneten Rechtecken gedruckt werden. Beide Muster greifen dabei schachbrettartig ineinander. Die N-terminale Aminosäure Asparaginsäure wird anschließend in einem letzten Schritt wieder uniform an den Träger gekoppelt, gefolgt vom Abspalten der Schutzgruppen.

Abbildung 13

Die Syntheseorte der bei (A) dargestellten Peptide korrespondieren zu den bei (B) sichtbaren grauen Ovalen bzw. Rechtecken. Die Papierstreifen werden mit Milchpulver in PBS geblockt und mit anti FLAG M1 Antikörper bzw. mit einem anti Aktin Antikörper inkubiert. Der Nachweis des gebundenen 1. Antikörpers erfolgt mit Peroxidase konjugiertem Ziege anti Maus Antikörper (rotes Substrat) bzw. mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Ziege anti Maus Antikörper (blaues Substrat).

Abbildung 14

Kennzahlen eines Laserdruckers

Abbildung 15

Funktionsweise eines Farblaserdruckers:

Wie beim schwarz-weiß Laserdrucker (Abbildung 5) bestehen beim Farblaserdrucker die Tonerpartikel aus kleinen Polystyrolkugeln mit einem magnetischen Anteil. Sie haften aufgrund des magnetischen Anteils an einer Magnetwalze und springen von dort aufgrund elektrischer Anziehungskräfte auf die vom Laserstrahl beschriebene Selenwalze. Von dort springen die Tonerpartikel aufs Papier oder eine Kopierfolie und werden durch eine heiße Walze eingeschmolzen.

Im Unterschied zum schwarz-weiß Laserdrucker, muß ein Farblaserdrucker jedoch nicht nur einen Toner aufdrucken, sondern 4 verschiedenfarbige Tonerpartikel exakt nebeneinander drucken. Die Abbildung zeigt schematisch wie dieses Problem gelöst wird:

- die Selenwalze ist wesentlich größer als beim schwarz-weiß Laserdrucker
- damit kann der Laser ein ganzes Blatt auf diese Walze „schreiben“
- der Laser „beschreibt“ die Selenwalze mit der ersten Farbe
- eine Magnetwalze, die den ersten Farbtoner transportiert fährt an die Selenwalze heran
- von dort springen die Tonerpartikel auf die „beschriebene“ Selenwalze
- die Selenwalze ist eng mit einer genauso großen zweiten Walze gekoppelt
- auf diese Walze wird ein Blatt Papier aufgezogen und dort fixiert
- die beiden Walzen drehen sich gegeneinander
- damit wird der erste Toner auf das Papier übertragen, das fixiert bleibt
- der Laser „beschreibt“ die Selenwalze mit der zweiten Farbe
- anschließend fahren weitere Wechselmagnetwalzen an die Selenwalze heran
- die die weiteren Farben auf die Selenwalze und von dort auf das Papier übertragen
- erst wenn der gesamte Druckvorgang abgeschlossen ist, wird das Papier freigegeben

Abbildung 15b

Gerät für die kombinatorische Synthese:

Im Unterschied zu Abbildung 15 ist in dieser Abbildung die heiße Walze (Nr.6) durch eine Vorrichtung ersetzt worden, die es ermöglicht Kopplungsreagentien oder Waschlösungen in gasförmigem oder in flüssigem Zustand in Kontakt mit der sich drehenden „Trägerwalze“ zu bringen. Gasförmige Substanzen werden mithilfe einer breiten Düse zugeführt (nicht dargestellt), während Flüssigkeiten durch ein Endlosband in Kontakt mit dem auf der „Trägerwalze“ fixierten Träger der Molekülbibliothek gebracht werden. Die Wechselmagnetwalze mit den 4 verschiedenfarbigen Tonern wird ausgetauscht gegen eine Wechselmagnetwalze mit den 20 verschiedenen „Aminosäuretonern“.

Abbildung 16

Elektronisch nachjustierbarer Farblaserdrucker:

Eine Scannereinheit rastert ein auf den Träger aufgebrachtes Muster ab und vergleicht es mit demselben, bereits gespeicherten Muster. Wird dabei eine Abweichung vom Sollwert festgestellt, so wird das Bild, das in den Druckerspeicher geladen wird, elektronisch um diese Abweichung verschoben.

Abbildung 18

Werden normale fmoc-geschützte Aminosäuren mit freiem Carboxyterminus auf einen Träger gebracht, so müssen diese danach durch einen Aktivator und eine Base aktiviert werden. Dabei entsteht ein reaktiver Ester (siehe auch Abbildung 6, Nr.2), der sofort mit den freien Aminogruppen des Trägers abreagiert.

Liegt der Aktivator allerdings im Überschuß vor, so gibt es darüberhinaus noch eine unerwünschte Nebenreaktion: Der Aktivator koppelt außerdem direkt an die zur Verfügung stehenden freien Aminogruppen des Trägers, wobei die Zahl der zur Verfügung stehenden freien Aminogruppen bei jedem Syntheszyklus abnimmt.

Werden dagegen voraktivierte Aminosäuren gedruckt, so wird die Gefahr dieser Nebenreaktion vermieden. Die Abbildung zeigt als Beispiel einer solchen Voraktivierung ein Aminosäurenanhydrid, wodurch die Kopplungseffizienzen deutlich erhöht werden.

Abbildung 19A + 19B

Verfahren für die kombinatorische Synthese

Bei den gebräuchlichen lithographischen Syntheseverfahren wird aufgrund der Einwirkung von Licht der Syntheseort für die aktivierten Monomere zugänglich gemacht (Abbildung 19A), oder aber es werden lichtempfindliche Schutzgruppen abgespalten (Abbildung 19B), wodurch eine lokal definierbare Kettenverlängerung ermöglicht wird. Ein Vorteil beider Verfahren ist ihre hohe Auflösung. Ein Nachteil beider Verfahren ist, daß nacheinander der gesamte Syntheszyklus für jedes einzelnes Monomer durchlaufen wird, was auf Kosten der Qualität geht.

Abbildung 19C + 19D

Abbildung 19D beschreibt das spotten (oder drucken mit einem Tintenstrahldrucker) von Monomeren auf einen Träger. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, daß parallel eine ganze Schicht von unterschiedlichen Monomeren auf den Träger aufgebracht werden kann und nicht jede Monomerart gesondert gekoppelt werden muß. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die rel. schlechte Auflösung.

In Abbildung 19C ist das oben im Text vorgestellte Verfahren dargestellt. Es kombiniert die Vorteile der anderen Methoden. Auch hier wird wie bei den lithographischen Verfahren die hohe Auflösung von Laserlicht ausgenützt, um eine dicht gepackte Molekülbibliothek zu erhalten. Andererseits kann auch damit parallel eine ganze Schicht von unterschiedlichen Monomeren auf den Träger aufgebracht werden.

Abbildung 20

Nachteile des spottens von Monomeren

Wenn Papier mit Farbe bedruckt wird, so dürfen die gedruckten Chromophoren möglichst wenig diffundieren, da dies die Brillanz des gedruckten Bildes stören würde. Erreicht wird dies dadurch, daß aufgrund von schnellflüchtigen Bestandteilen in den verwendeten Tonerflüssigkeiten die aufgebrachten Chromophoren sehr schnell an Ort und Stelle fixiert werden. Darüberhinaus sind die verwendeten Chromophoren rel. groß, was ihre Diffusionsrate erheblich einschränkt. Außerdem werden spezielle, stark saugfähige Hochglanzpapiere verwendet.

Die aufgebrachten Monomere (für eine kombinatorische Synthese) werden dagegen sehr viel weiter diffundieren, da das für die Synthese verwendete Lösungsmittel sehr schlecht flüchtig ist, da Zeit für die Kopplung der Reaktionspartner gebraucht wird. Die verwendeten Monomere sind darüberhinaus vergleichsweise klein, was ihre Diffusionsrate erheblich erhöht. Spezialpapiere eignen sich normalerweise nicht als Träger einer Molekülbibliothek.

Abbildung 21

Bei allen Druckverfahren wird immer eine ganze Schicht von unterschiedlichen Monomeren auf den Träger aufgebracht, die dann alle zusammen einen Kopplungszyklus durchlaufen bevor wiederum die nächste Schicht von Monomeren aufgedruckt wird. Bei den in Abbildung 19A & 19B dargestellten lithographischen Syntheseverfahren dagegen muß jede Art von Monomer nacheinander einzeln aufgebracht, gekoppelt und überschüssige Monomere gewegewaschen werden. Dies bedeutet, daß für die Synthese desselben Arrays von Oligomeren, die lithographischen Synthesemethoden $N \times$ mehr Kopplungszyklen durchlaufen müssen als bei den Druckverfahren nötig (Abbildung 19C & 19D). Die Zahl N steht dabei für die Anzahl unterschiedlicher Monomere, d.h. für die Synthese eines Arrays von Oligopeptiden brauchen die lithographischen Synthesen $20 \times$ mehr Kopplungszyklen verglichen mit den Druckverfahren.

Abbildung 22**konfokales Lasermikroskop**

Affymetrix scannt seine Arrays mithilfe eines konfokalen Lasermikroskops ab. Dabei müssen jedoch alle 3 Dimensionen des Raums durchsucht werden, bis das gewünschte Signal eindeutig identifiziert werden kann. Verglichen damit ist ein Scanner viel schneller:

1. Er hat nicht nur einen Laser zur Verfügung sondern arbeitet parallel mit einem eindimensionalen Array von Leuchtdioden.
2. Da das Licht der Leuchtdioden nahezu parallel den Träger durchstrahlt, fällt beim Scanner das Suchen in der dritten Dimension des Raumes weg.

Abbildung 23

Die ca. 100.000 Gene des Menschen codieren durchschnittlich etwas weniger als 500 Aminosäuren pro Gen. In wenigen Jahren werden die meisten dieser Gene bekannt sein. Jedes dieser Genprodukte kann durch durchschnittlich 100 überlappende 15er Peptide repräsentiert werden, die jeweils um 5 AS gegeneinander verschoben sind. Insgesamt werden dann ca. 10 Millionen verschiedene Peptide benötigt, um das ganze menschliche Genom abzudecken.

Abbildung 23x

Anwendungsbeispiele für das in Abbildung 23 beschriebene Array von Genprodukten.

Abbildung 24**„Vollständige“ Peptidbibliotheken**

Arrays der dargestellten Decamergemische können mithilfe des weiter oben beschriebenen Verfahrens auf einem Träger synthetisiert werden. Dabei werden auf dem Array alle denkbaren Kombinationen der mit N bezeichneten Aminosäuren abgedeckt.

Abbildung 25**Korrelation von Krankheit mit Peptidmuster**

Die differentielle Färbung eines hochkomplexen Arrays von Peptiden mit Kontrollserum und dem Serum von Patienten ermöglicht die Identifizierung von Patienten spezifischen Färbemustern. Damit können mehrere Krankheiten parallel diagnostiziert werden, oder umgekehrt mithilfe der aufgefundenen Peptide bisher unbekannten Krankheitsursachen nachgespürt werden. Im angegebenen Beispiel werden Peptide identifiziert, die exprimierten Genprodukten von *Helicobacter pylori* entsprechen, dem Verursacher von Magengeschwüren.

Abbildung 25x

Anwendungen für das Array einer Penta oder Hexapeptidbibliothek.

Abbildung 26

Suche nach Enzyminhibitoren

Zwei verschiedene Enzymnachweise ermöglichen die differentielle Identifizierung von Peptiden, die das Enzym zwar binden, aber gleichzeitig seine Enzymaktivität blockieren. Diese Module von D-Peptiden eignen sich als Bausteine für potentielle Therapeutika.

Patentansprüche

Verfahren und Vorrichtungen zum Aufbringen von Substanzen, insbesondere von Molekülen auf einen Träger, dadurch gekennzeichnet,

- daß eine immobilisierte Substanz durch Veränderung der physikalischen Umgebung, insbesondere der Matrixschicht, beweglich gemacht wird,
- daß die so beweglich gemachte Substanz durch einen physikalischen Prozeß in die Nähe des Trägers, insbesondere der Trägersoberfläche, gebracht wird,
- daß die so beweglich gemachte Substanz an auf dem Träger befindliche Moleküle oder Atome bindet, oder ein Aggregat bildet, oder mit diesen eine chemische Reaktion eingeht,
- daß die so beweglich gemachten Substanzen viele unterschiedliche Substanzen sind oder ergeben.

Anspruch 2

Verfahren und Vorrichtungen nach Anspruch 1, wobei die in Anspruch 1 genannte Substanz in Partikeln immobilisiert wird.

Anspruch 3

Verfahren und Vorrichtungen nach Anspruch 1 und 2, wobei die in Anspruch 2 genannten Partikel aufgrund physikalischer Prozesse ortsgenau in die Nähe eines Trägers gebracht werden.

Anspruch 4

Verfahren und Vorrichtungen nach Anspruch 1 bis 3, wobei der ortsgenaue Transfer der Partikel nach Anspruch 3 mithilfe eines Laserdruckers, insbesondere eines Farblaserdruckers erfolgt.

Anspruch 5

Verfahren und Vorrichtungen nach Anspruch 4, wobei die Tonerpartikel eines Laserdruckers, insbesondere eines Farblaserdruckers, mit den in Anspruch 2 genannten Partikeln ersetzt werden.

Anspruch 6

Verfahren und Vorrichtungen nach Anspruch 1 bis 5, wobei in einem repetitiven Prozeß die genannten Partikel wiederholt ortsgenau auf den Träger aufgebracht werden, jeweils

gefolgt von dem in Anspruch 1 beschriebenen beweglich machen der immobilisierten Substanz.

Anspruch 7

Verfahren und Vorrichtungen nach Anspruch 6, wobei der Träger während des gesamten repetitiven Prozesses fixiert bleibt.



Kombinatorische Peptidsynthese mithilfe eines Laserdruckers

Zusammenfassung

Ziel der vorgestellten Methode ist die kombinatorische Synthese eines Arrays von möglichst vielen, möglichst dicht gepackten Peptiden auf einem Träger. Das Neue dieser Methode, ist der Einsatz eines Laserdruckers, um unterschiedliche Monomere möglichst dicht gepackt auf den Träger zu bringen. Ein Laserdrucker funktioniert wie folgt:

1. der verwendete Toner besteht aus kleinen Polystyrolkugeln mit einem magnetischen Anteil
2. die Tonerpartikel haften aufgrund des magnetischen Anteils an einer Magnetwalze
3. eine Selenwalze wird durch das ein und ausschalten eines Lasers beschrieben, der die Selenwalze partiell entlädt
4. da wo die Selenwalze definiert entladen wurde, können die Tonerpartikel aufgrund elektrischer Anziehungskräfte von der Magnetwalze auf die Selenwalze springen
5. von der Selenwalze springen die Tonerpartikel aufs Papier oder eine Kopierfolie und
6. werden durch eine heiße Walze eingeschmolzen.

Ganz analog zum normalen Toner wurde ein "Aminosäurentoner" hergestellt, wobei anstelle der Chromophoren mit einer Schutzgruppe versehene Aminosäuren in bei Raumtemperatur feste Partikel eingebunden sind. Das Äquivalent der bei Raumtemperatur festen Polystyrolkugeln des normalen Toners ist dabei Diphenylformamid mit einem Schmelzpunkt bei etwa 71°C. Diese Partikel können nach dem oben beschriebenen Prinzip des Laserdruckers definiert auf einen Träger gedruckt und darüberhinaus an einen Träger gekoppelt werden.

Der Beweis des Prinzips erfolgte durch die Synthese eines Peptids unter Einsatz eines Laserdruckers, wobei das synthetisierte Peptid mithilfe eines monoklonalen Antikörpers nachgewiesen werden konnte.

Um die immense Zahl von Bildpunkten, die ein Laserdrucker auflösen kann, in eine ähnlich große Zahl von Peptiden zu überführen, wird der Prototyp eines Peptidsynthesizers gebaut, dessen Herzstück aus einem Farblaserdrucker besteht. Moderne Farblaserdrucker ermöglichen die exakte räumliche Zuordnung von 4 Farben, was in einem rel. einfachen Eingriff auf 20 oder mehr verschiedene Toner ausgedehnt werden kann. Diese räumliche Zuordnung kann sehr einfach auch für die darauffolgenden Schichten von aufgedruckten Aminosäuren beibehalten werden, dann nämlich, wenn vor dem aufdrucken der jeweils nächsten Schicht von Aminosäuren eine Kopplungsreaktion auf dem rel zur Selenwalze fixierten Träger stattfindet.

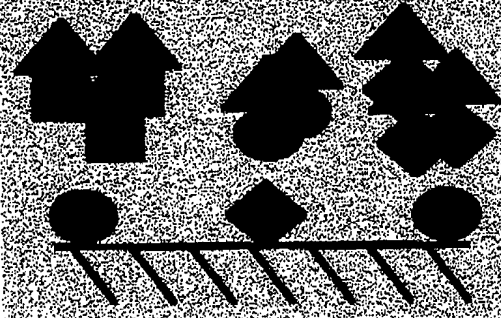
Es gibt zahlreiche Anwendungen für hochkomplexe Peptidarrays, beispielsweise können etwa 10 Millionen 15mere auf einem Filter alle menschlichen Genprodukte repräsentieren. Die damit erhaltenen Serumprofile ermöglichen Rückschlüsse auf Autoimmunkrankheiten, Krebskrankheiten und evtl. auf Krankheiten unbekannter Ursache. Ein solcher Array hilft auch bei der Suche nach Interaktionspartnern, beispielsweise von viralen Genprodukten.

Anmerkung:

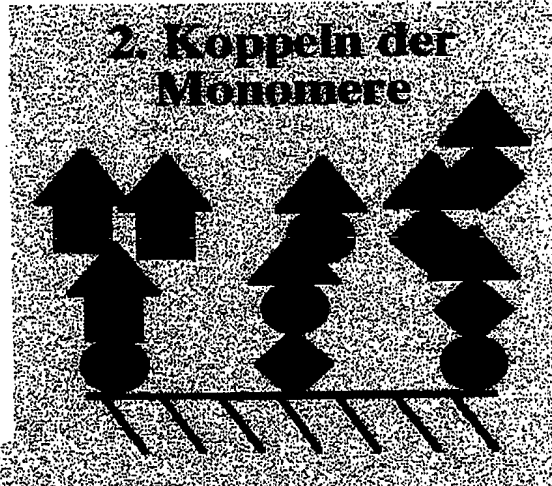
Die „Selenwalze“ enthält mittlerweile kein Selen mehr, sondern ein Laser-beschreibbares organisches Material.

Kombinatorische Synthese

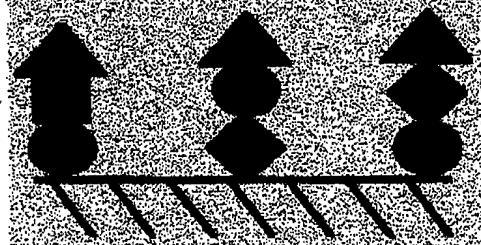
**1. Aufbringen
unterschiedlicher
Monomere**



**2. Koppeln der
Monomere**



**3. Wegwaschen
ungebundener
Monomere**



**4. Abspalten der
Schutzgruppen**

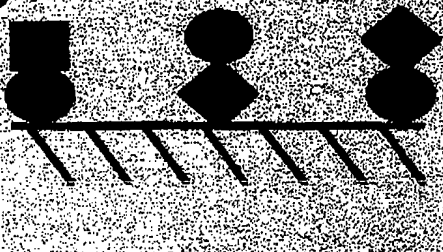


Abb. 3

Komplexität kombinatorischer Peptidbibliotheken

$20^1 = 20$ verschiedene Aminosäuren

$20^2 = 400$ verschiedene Dipeptide

$20^3 = 8.000$ verschiedene Tripeptide

$20^4 = 160.000$ verschiedene Tetrapeptide

$20^5 = 3,2$ millionen verschiedene Pentapeptide

$20^6 = 64$ millionen verschiedene Hexapeptide

$20^7 = 1.280$ millionen verschiedene Heptapeptide

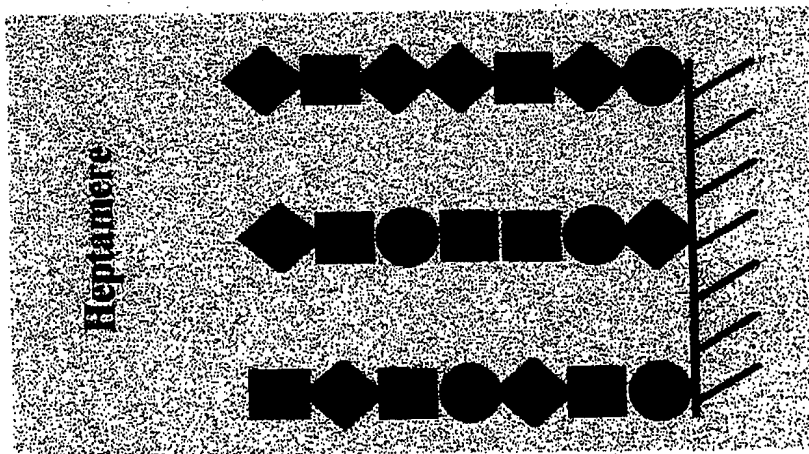


Abb. 4 Abb.4

Funktionsweise eines Laserdruckers

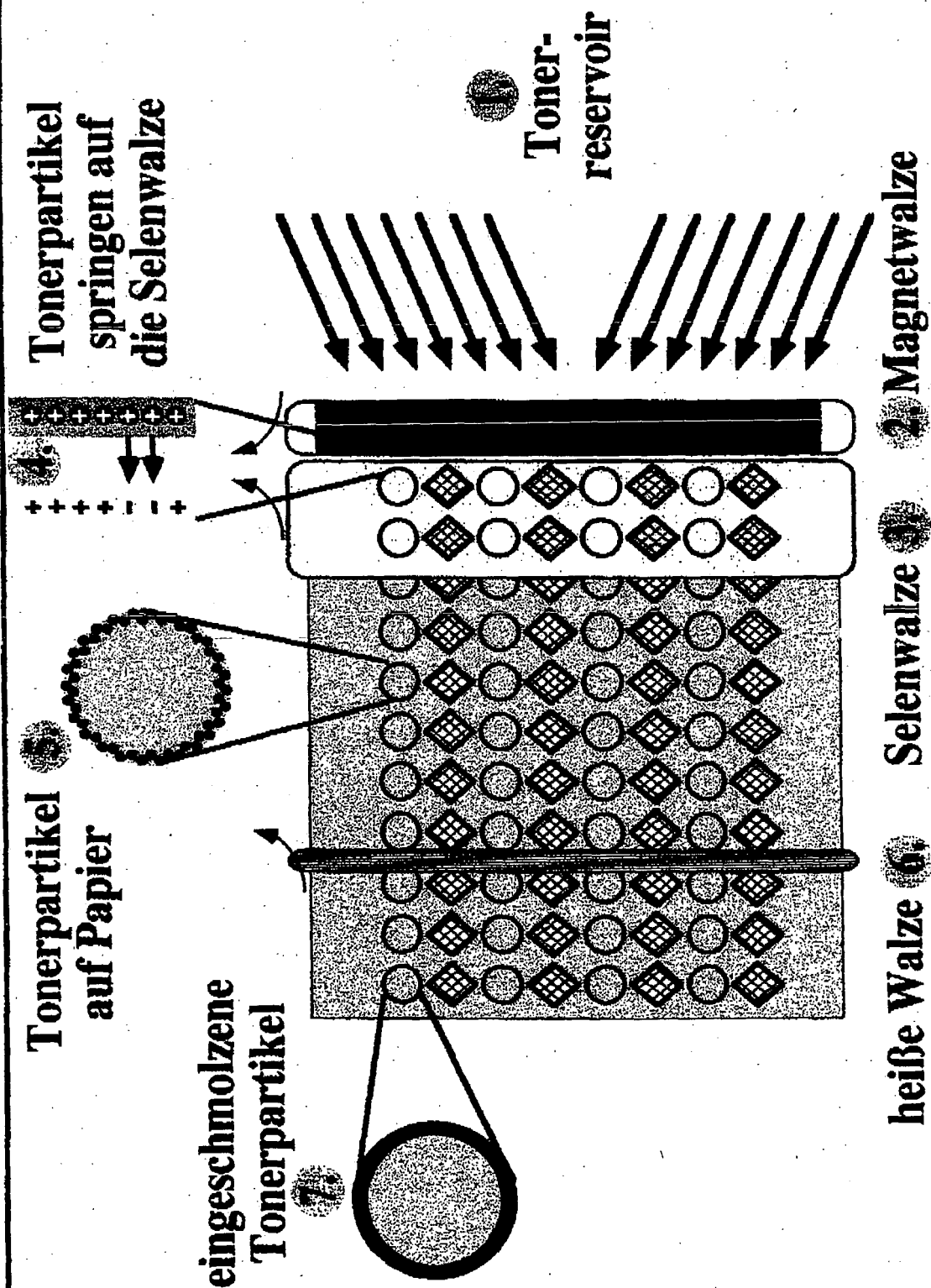


Abb. 5 Abb. 5

Derivatisiertes Papier als Träger für die Peptidsynthese

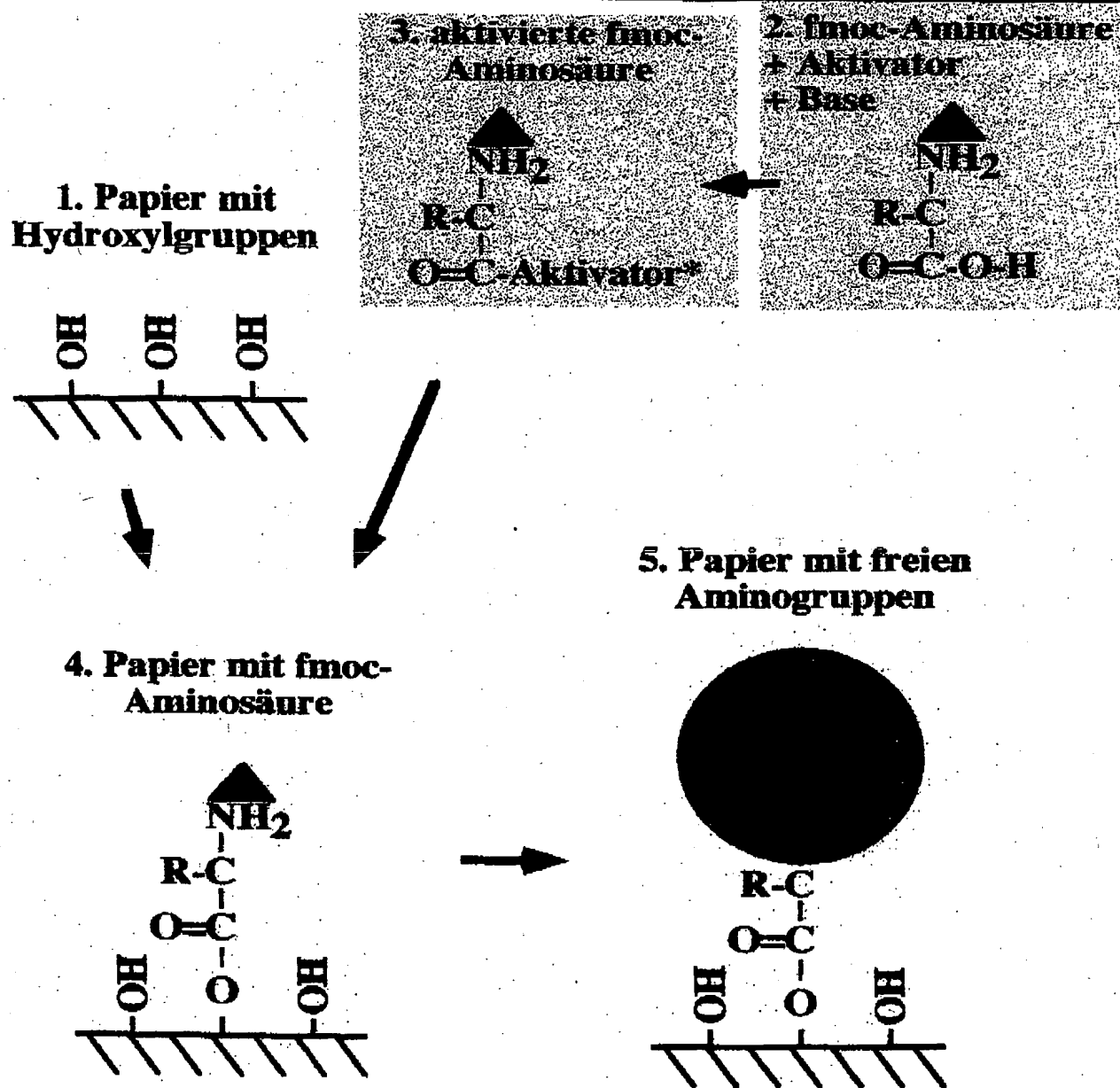


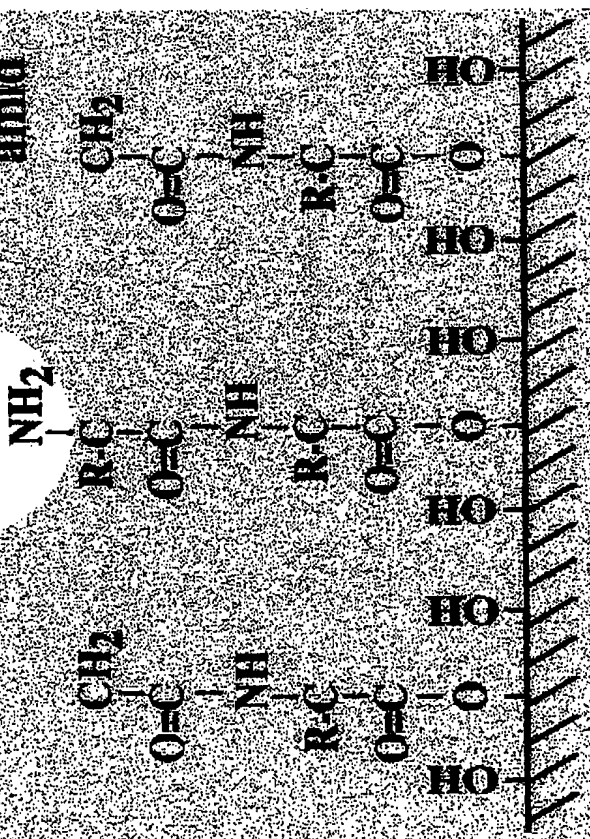
Abb. 6 Abb. 6

Nachweis von freien Aminogruppen mit Bromphenolblau

A SPOTs mit freien Aminogruppen

Brom-
phenol-
blau

Essig-
säure-
amid



B SPOTs

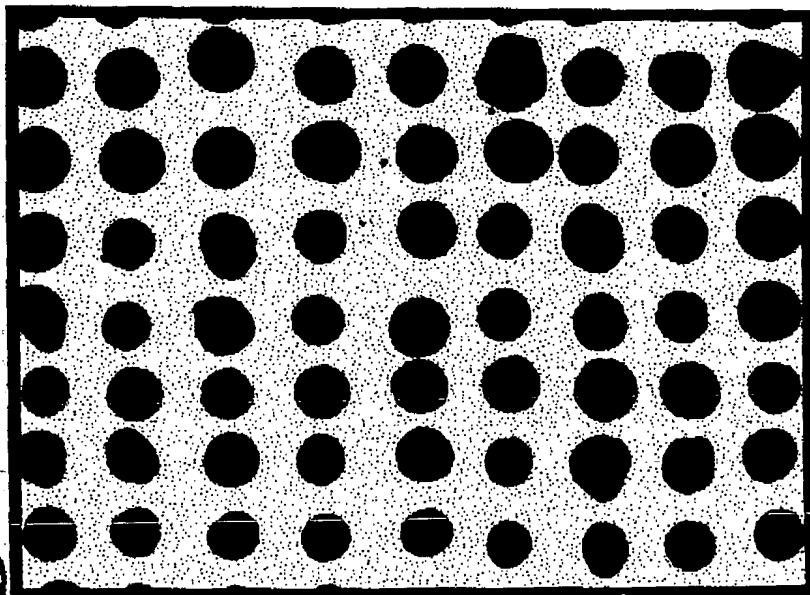
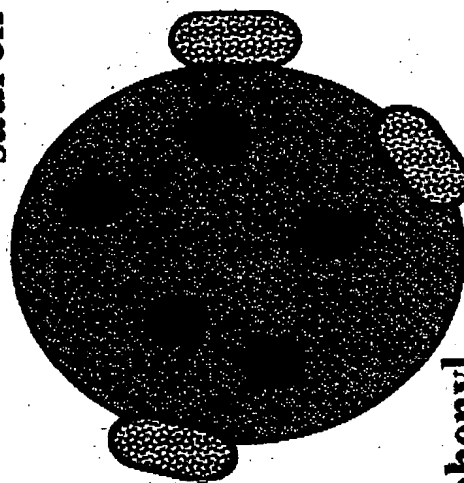


Abb. 7

Aminosäuren-Tonerpartikel

**Aminosäuren-
Tonerpartikel**

fmoc-
Amino-
säuren

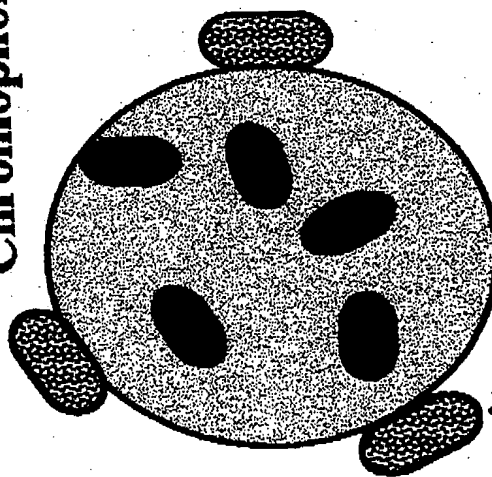


Diphenyl-
formamid

Magnetit

**normale
Tonerpartikel**

Chromophoren

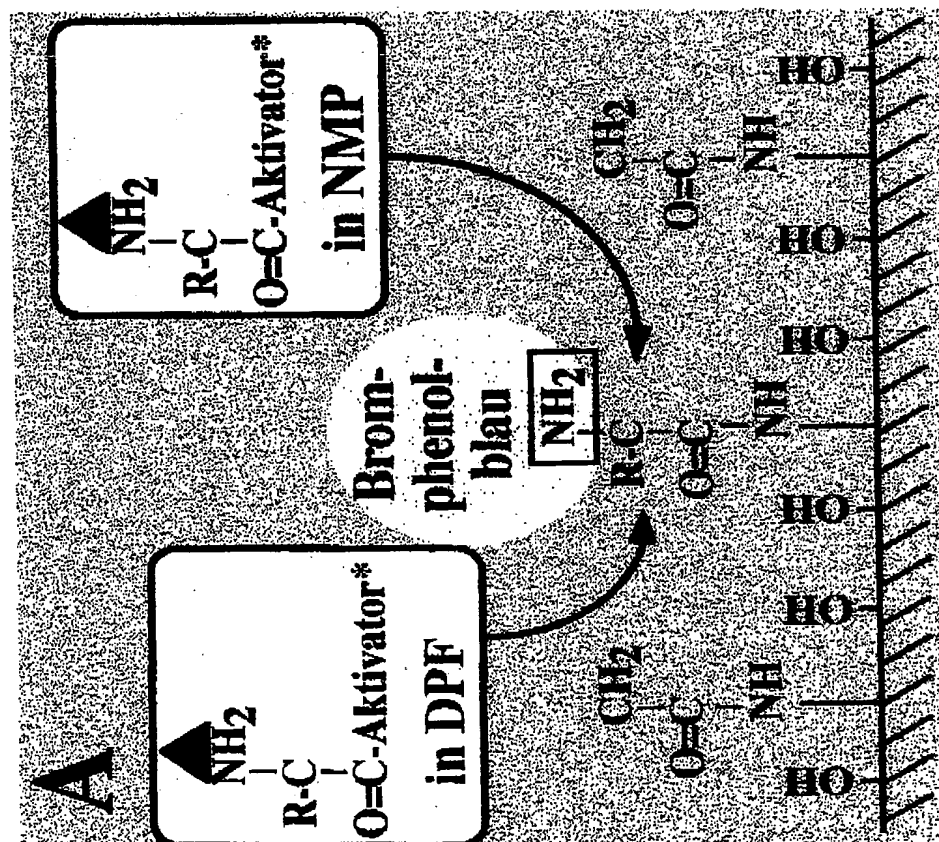


Magnetit

Polystyrol

Abb. 8

Die Kopplung an den Träger funktioniert in Anwesenheit von Diphenylformamid (DPF)



Aktivator: HB3TU in NMP



Fmoc-Alanine in:

DPI

NMP

DPF

NVP

DPF

NP

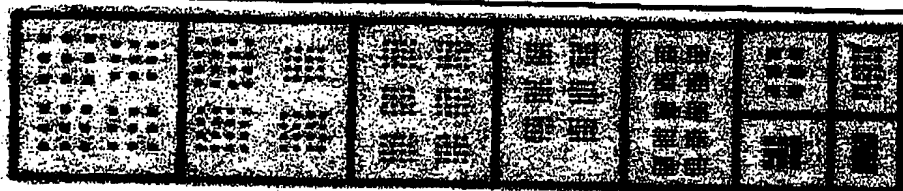
Base 1

Base 2

Base 3

466.9

Aminosäuren mit Schutzgruppen können mithilfe eines Laserdruckers gedruckt werden

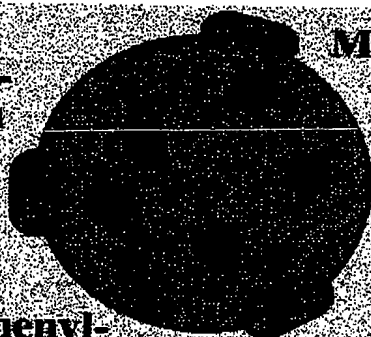


**normaler
Toner**

**fmoc-
Amino-
säuren**

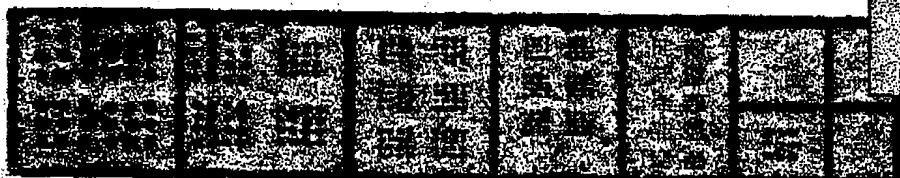
Magnetit

**Diphenyl-
formamid**

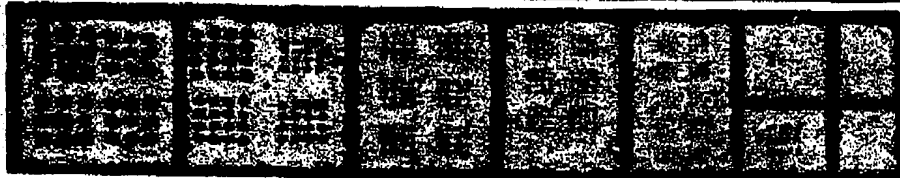


Papier

1 cm



fmoc-Ala



fmoc-Lys



fmoc-Thr

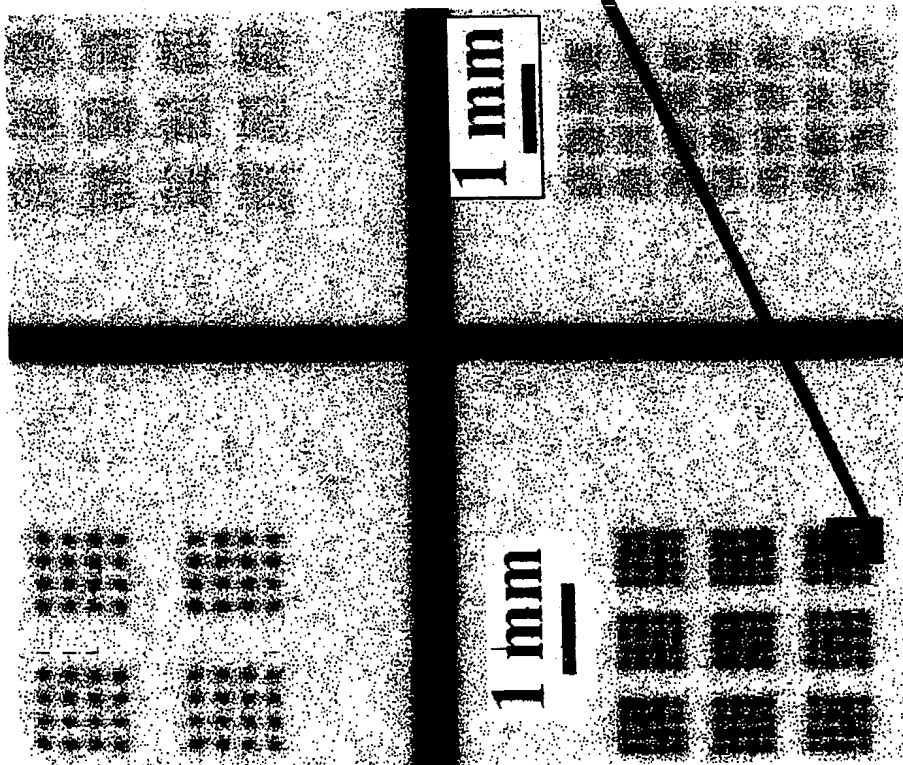


fmoc-Asp

Abb. 10

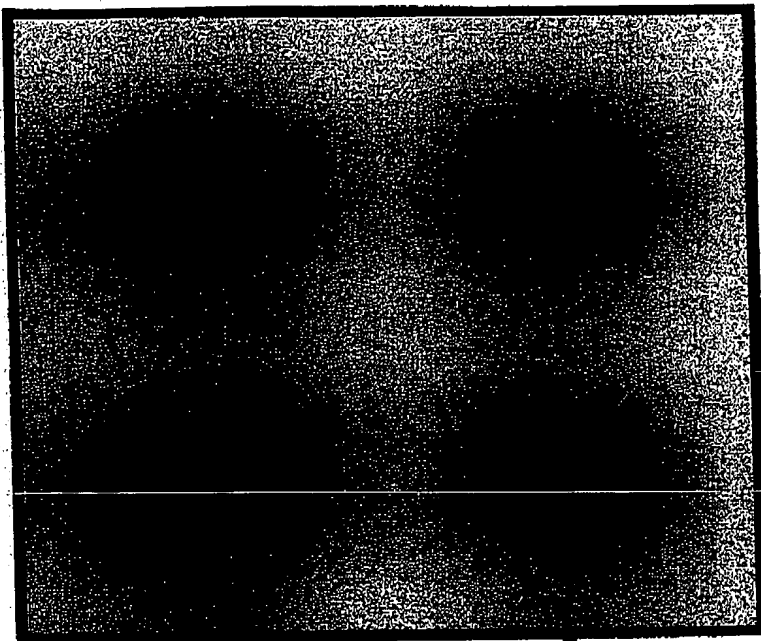
Die Auflösung handelsüblicher Geräte:

Laserdrucker mit 600dpi



normaler Toner

Scanner mit 4.800dpi

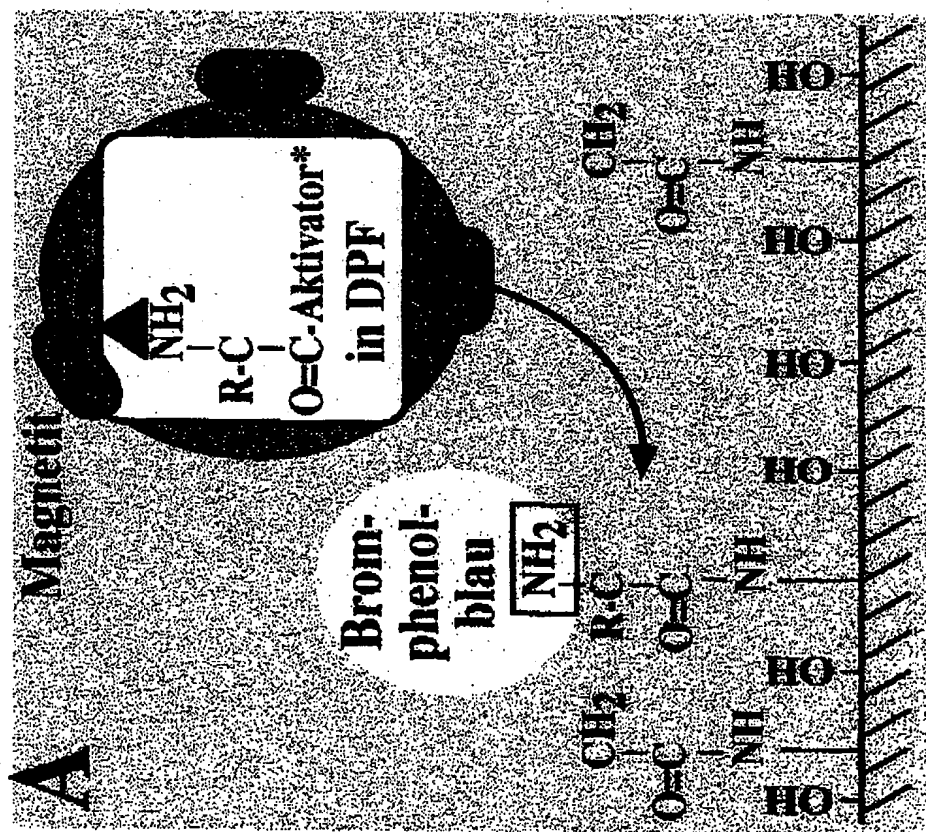


50 µm

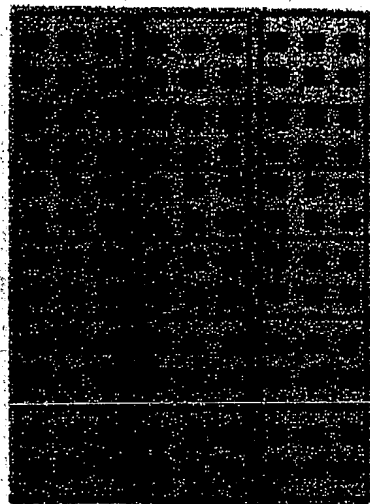
normaler Toner

Seite 106 A66 106

Aufgedruckte Aminosäuren können an den Träger gekoppelt werden



B normales Druckbild



gekoppelte Aminosäure

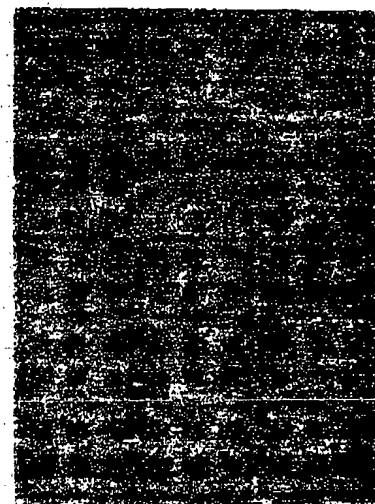


Abb. 11

Synthese von 2 Peptiden mithilfe eines Laserdruckers

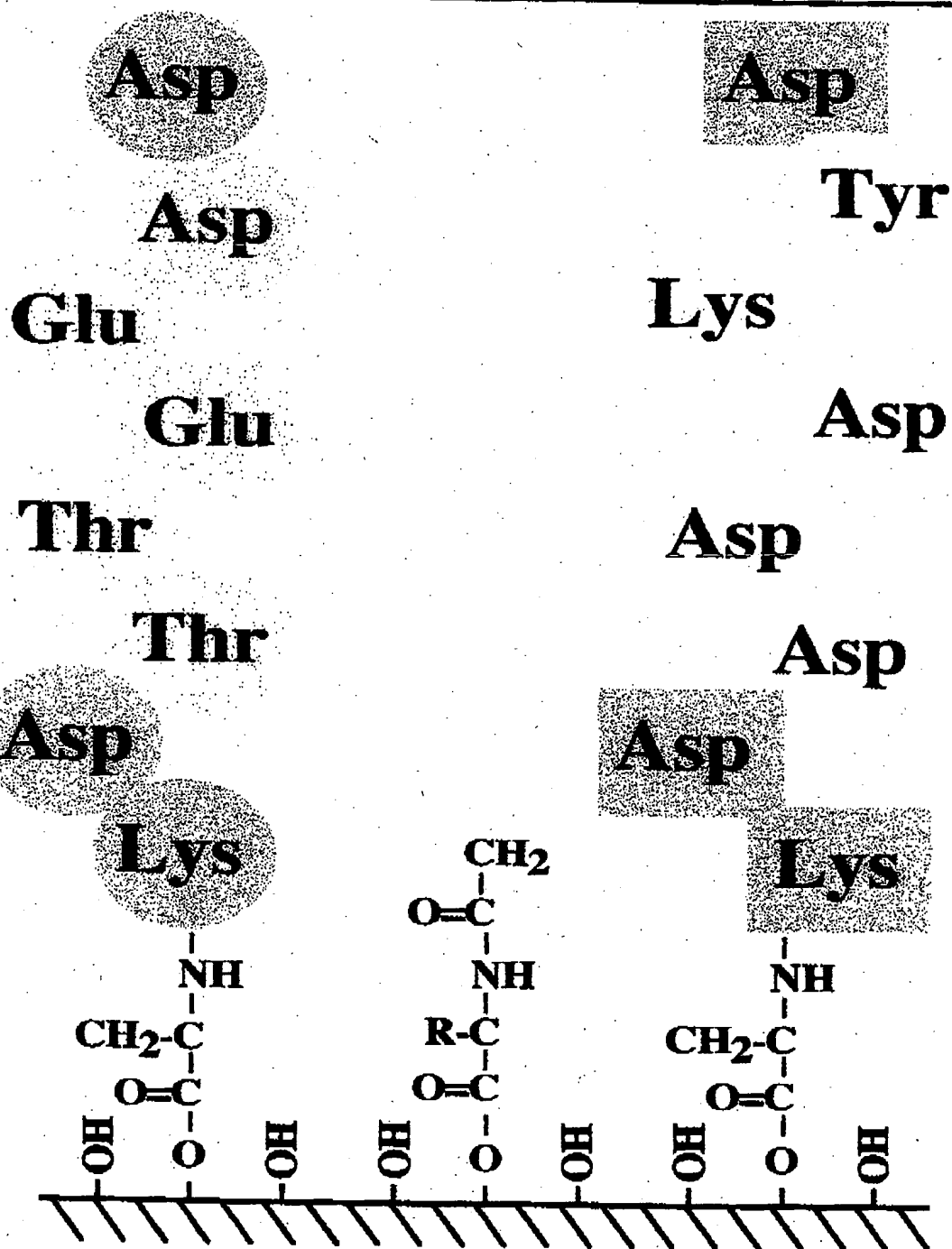
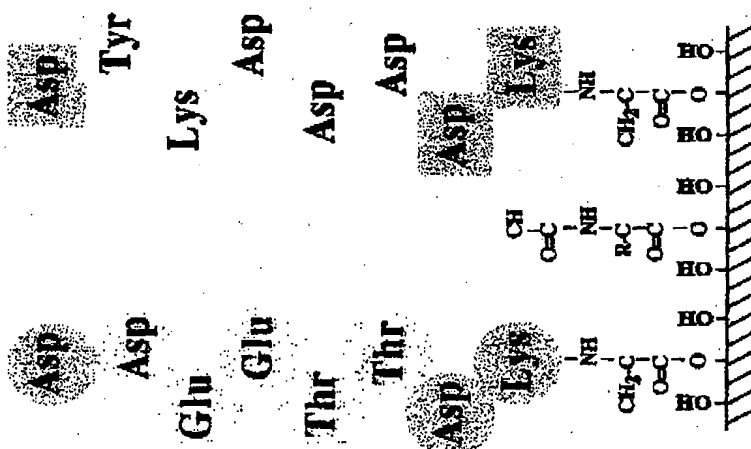


Abb. 12

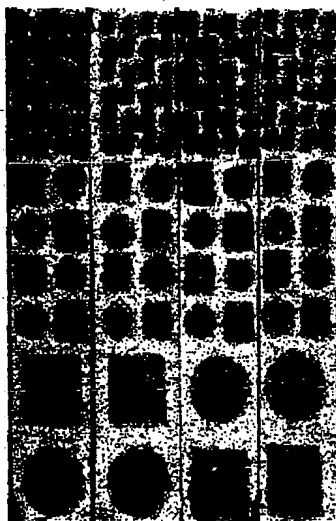
Mithilfe eines Laserdruckers synthetisierte Peptide werden von einem monoklonalen Antikörper erkannt

A

synthetisierte Peptide

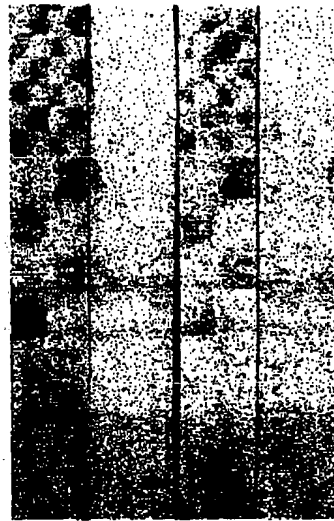
**B**

Vorderseite



anti-FLAG Antikörper
anti-Aktin Antikörper
anti-FLAG Antikörper
anti-Aktin Antikörper

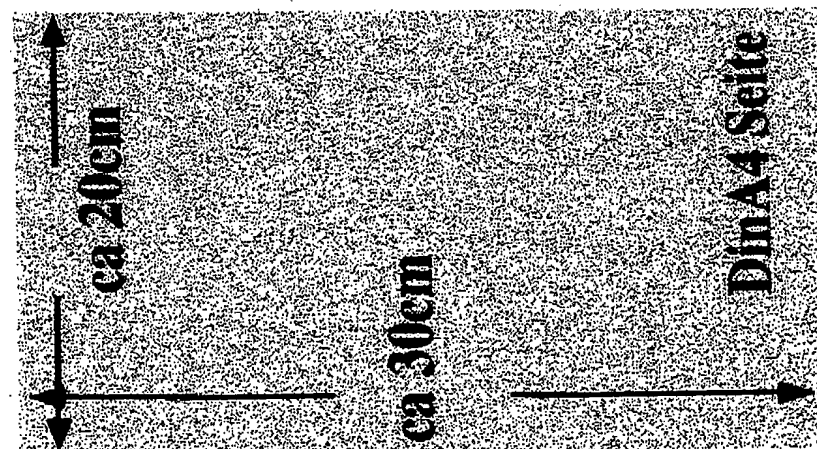
Rückseite



anti-FLAG Antikörper
anti-Aktin Antikörper
anti-FLAG Antikörper
anti-Aktin Antikörper

Abb. 13

Kennzahlen eines Laserdruckers



600 dpi = 600 dots per inch

600 dpi = ca 1 dot alle 40 μ m

1.200 dpi = ca 1 dot alle 20 μ m

2.400 dpi = ca 1 dot alle 10 μ m

4.800 dpi = ca 1 dot alle 5 μ m

Dots pro DinA4 Seite:

600 dpi = ca 5.000 x 7.500 = ca 30 millionen dots

1.200 dpi = ca 10.000 x 15.000 = ca 125 millionen dots

2.400 dpi = ca 20.000 x 30.000 = ca 500 millionen dots

4.800 dpi = ca 40.000 x 60.000 = ca 2 milliarden dots

Abb. 14

Funktionsweise eines Farblaserdruckers

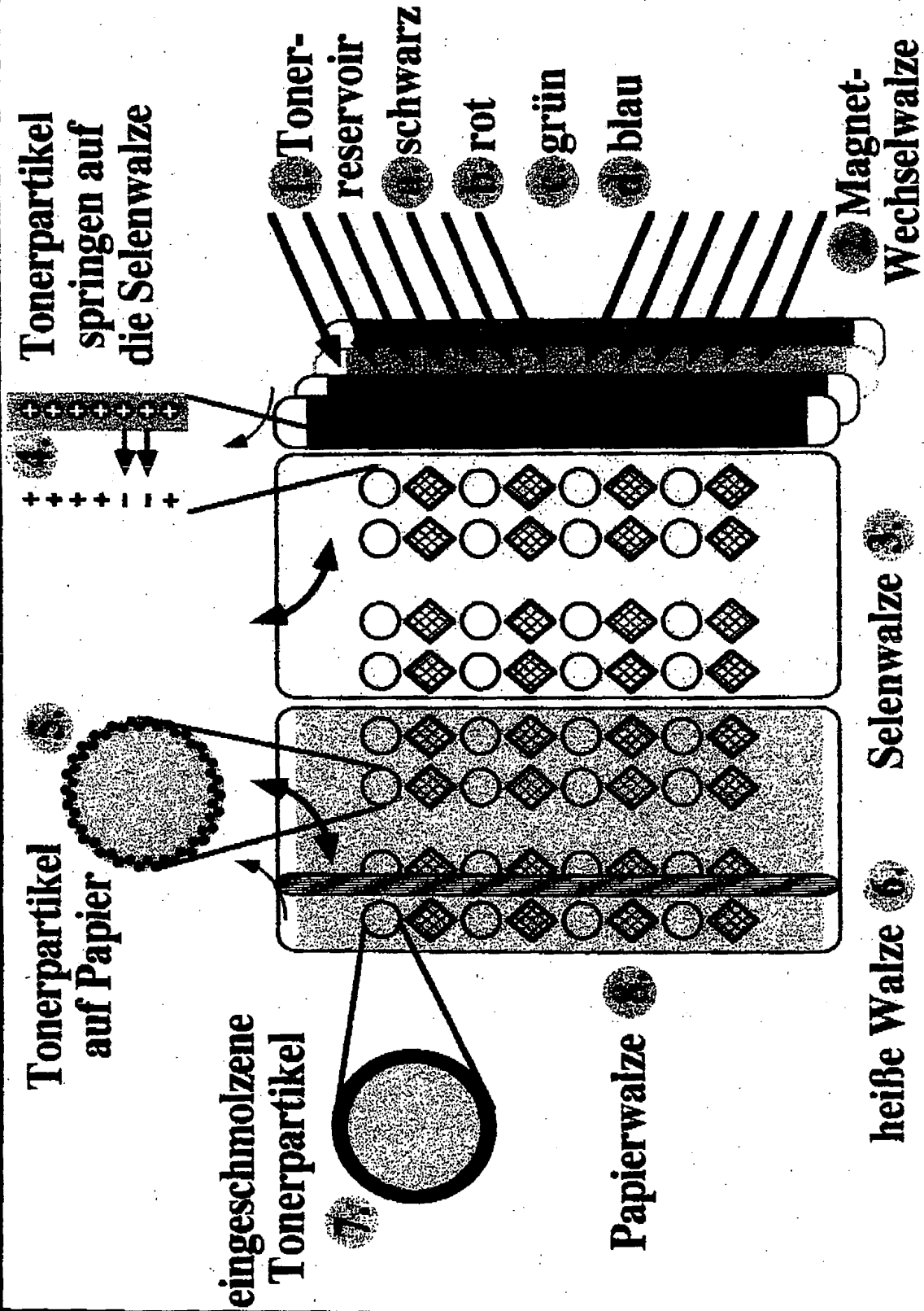


Abb. 15 Abb. 15

Peptidsynthese mit einem Farblaserdrucker

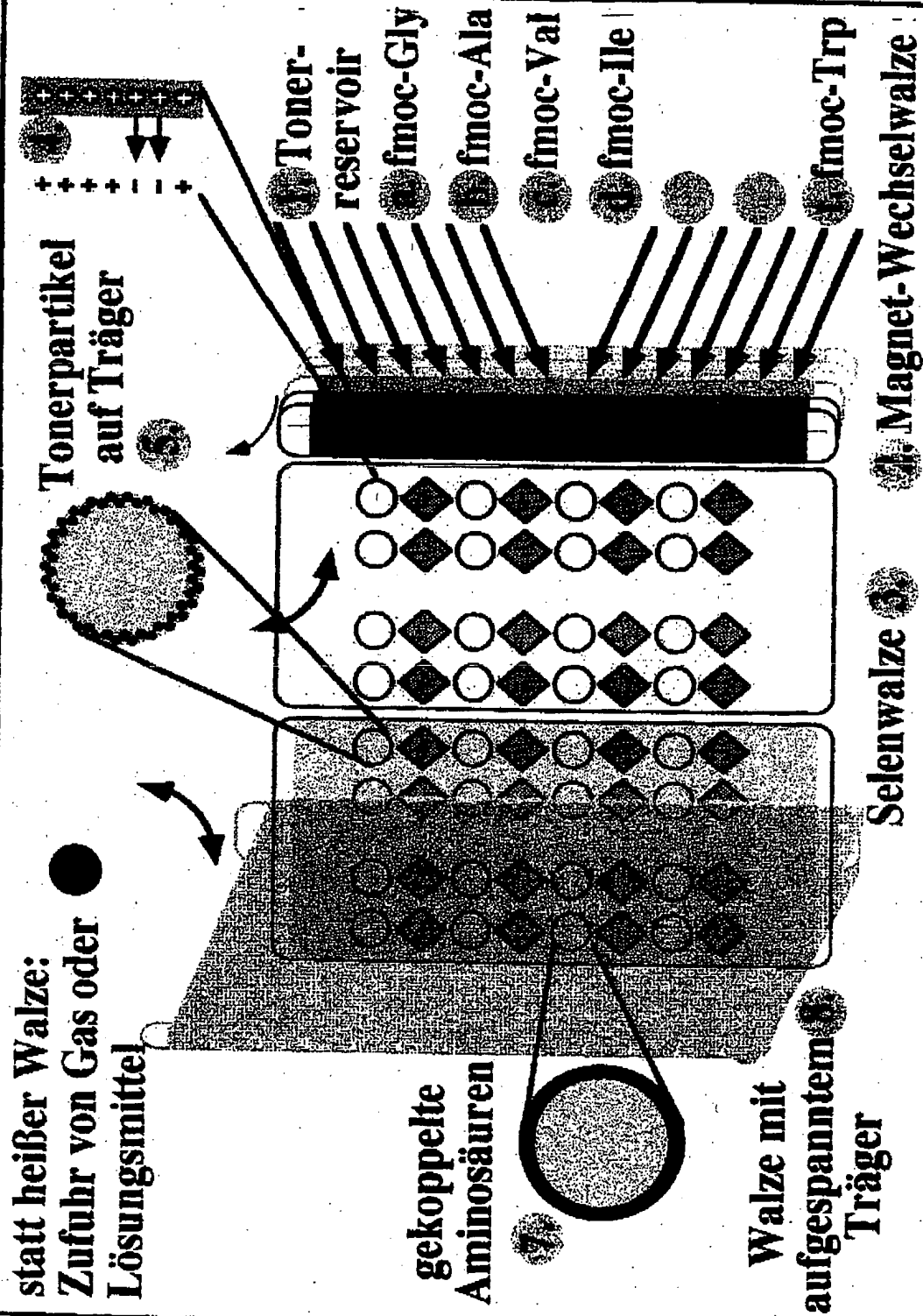


Abb 15b

Nachjustieren mithilfe eines Scanners

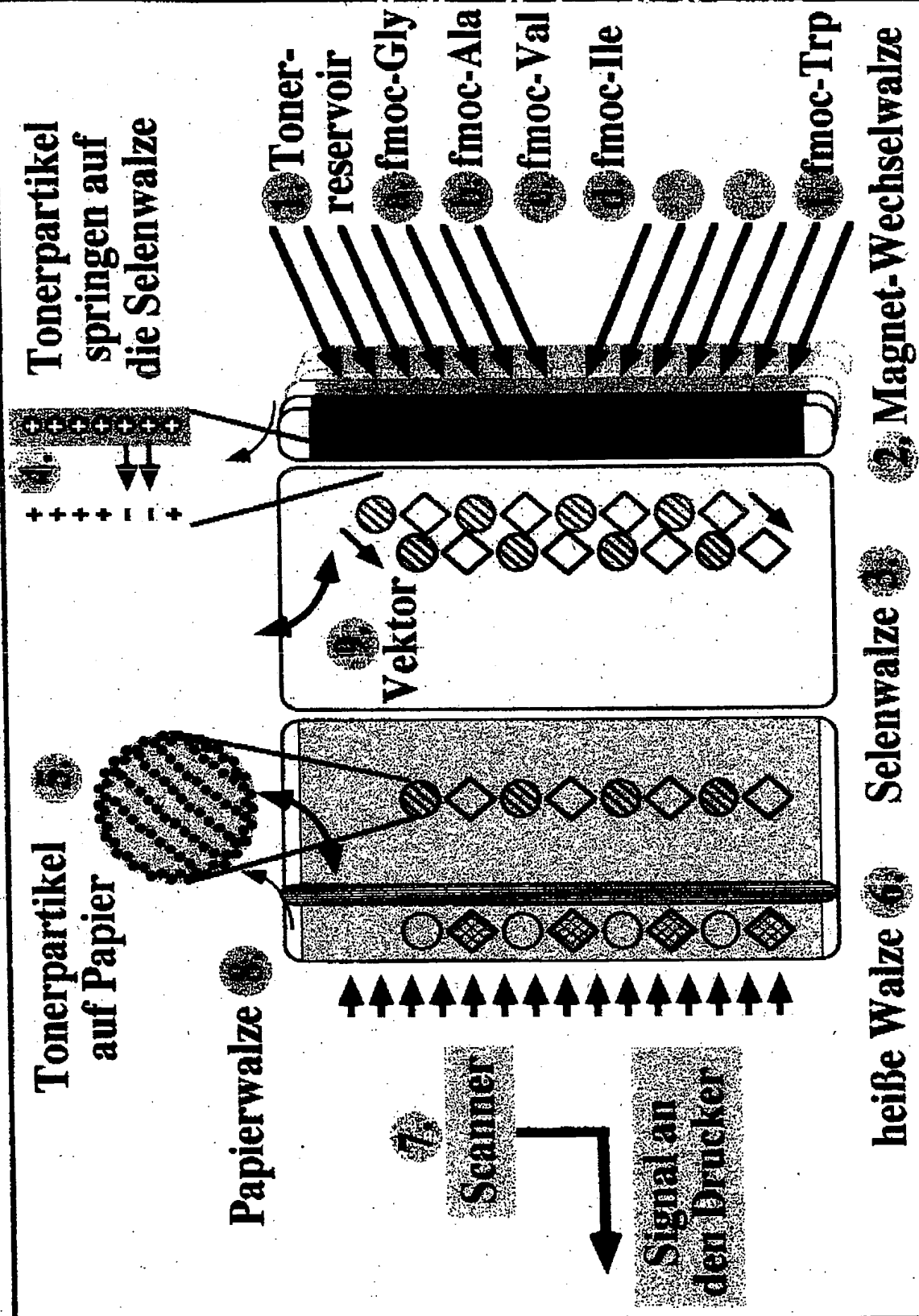


Abb. 16

Abb. 16

Die Anhydride von fmoc Aminosäuren geben bessere Kopplungseffizienzen

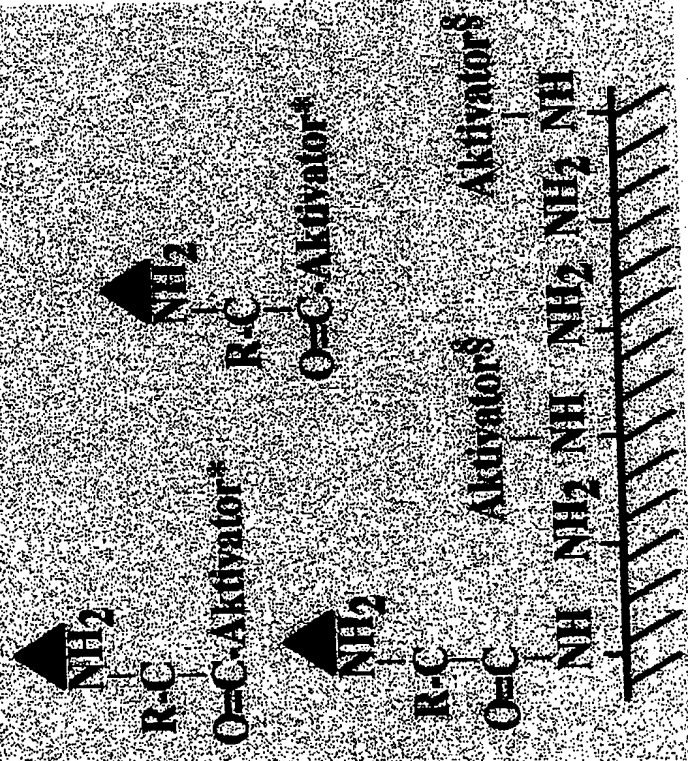
derivatisiertes Papier mit freien

Aminogruppen

+ fmoc-Aminosäure

+ Aktivator

+ Base



derivatisiertes Papier mit freien

Aminogruppen

+ fmoc-Aminosäureanhydrid

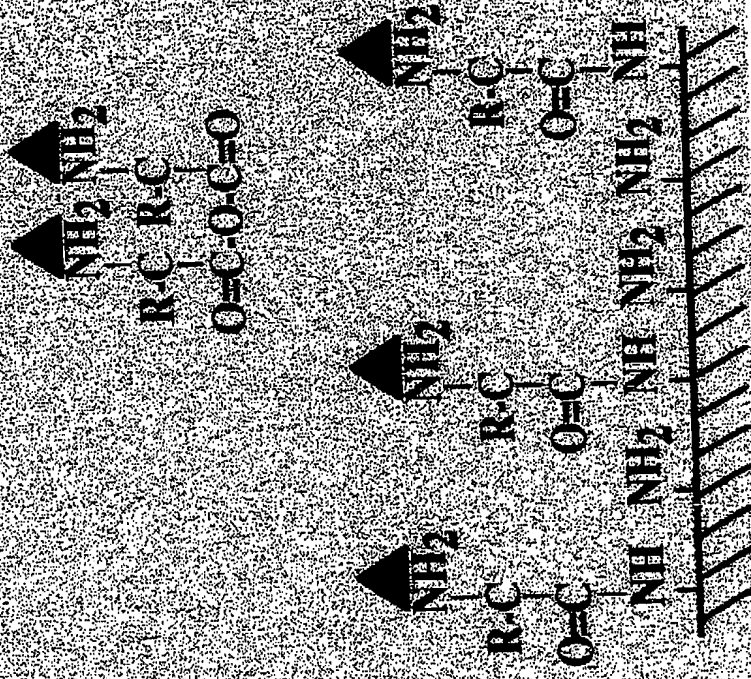
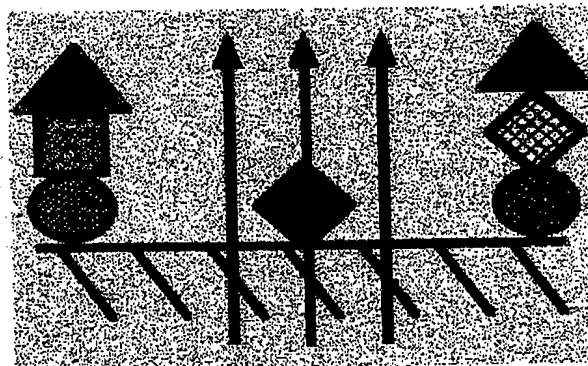
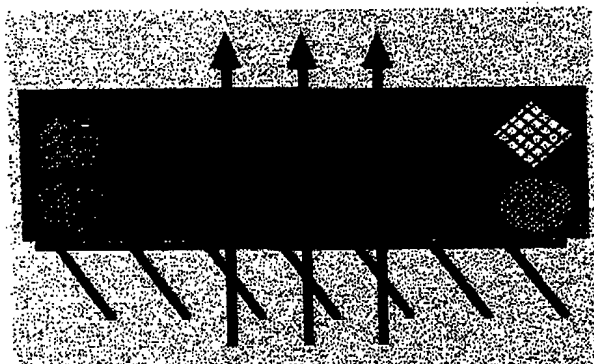
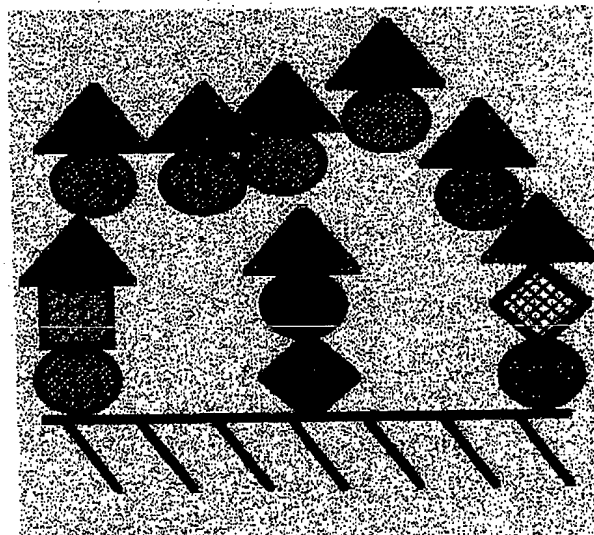
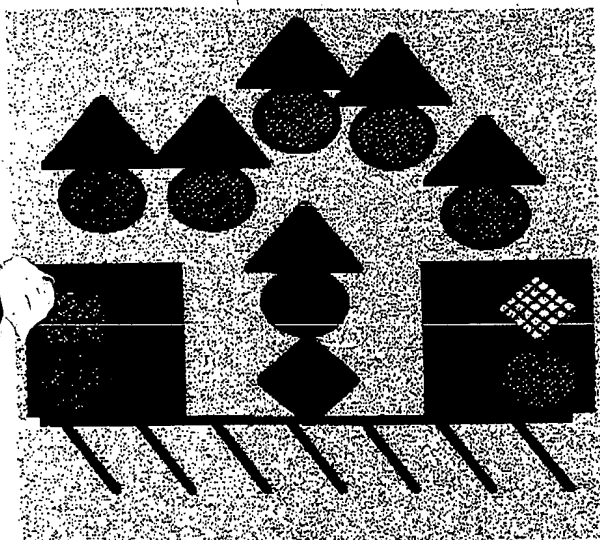


Abb. 18

Lithographische Synthesemethoden

A Zugang zum
Syntheseort
durch Licht

B Abspalten der
Schutzgruppen
durch Licht



Vorteile:
konkurrenzlos hohe Auflösung

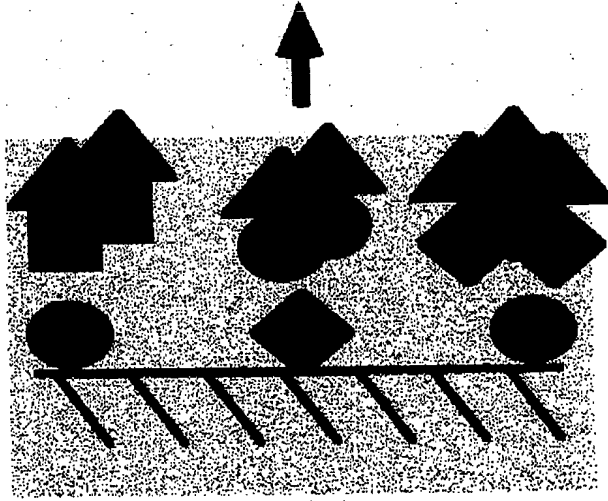
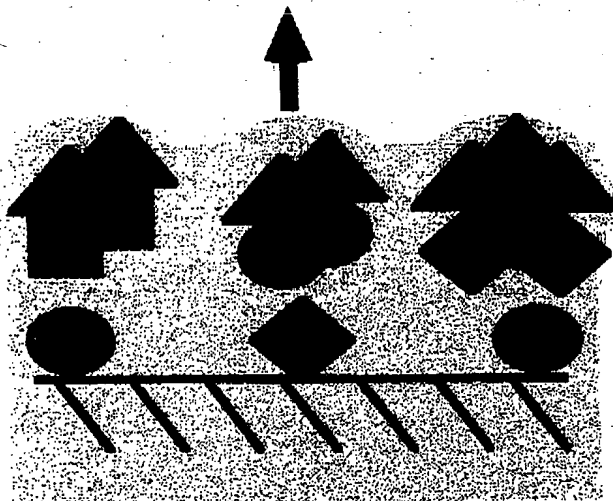
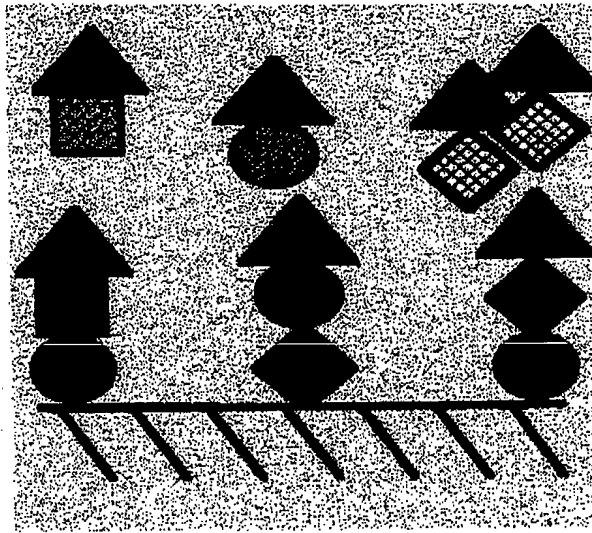
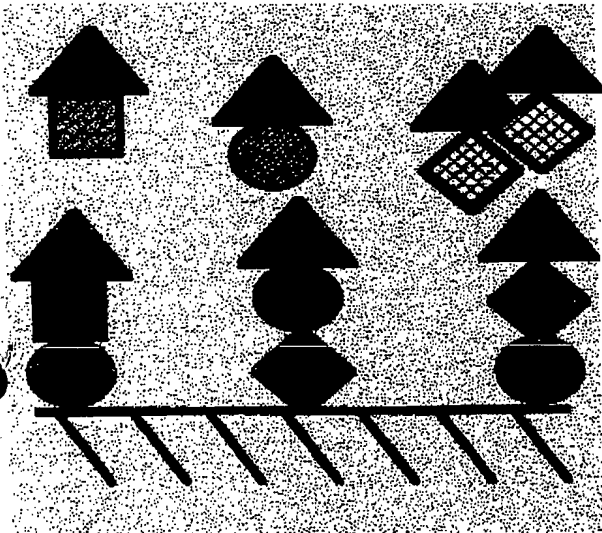
Nachteile:
bei jedem Layer müssen alle Monomere nacheinander
an den Träger gekoppelt werden

Abb. 19 A + 19 B

Kombinatorische Synthesemethoden

C Aufdrucken mit
einem
Laserdrucker

D Spotten oder
Tintenstrahl-
drucker



Vorteile:

paralleles Aufbringen aller Monomere

Nachteile:

verlaufen / verdunsten des Lösungsmittels

unerwünschte Diffusion der Monomere

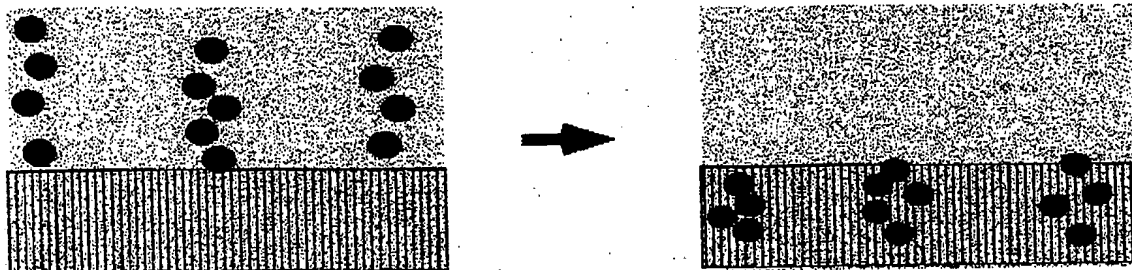
schlechte Auflösung

Abb. 19C + 19D

Fig. 19C + 19D

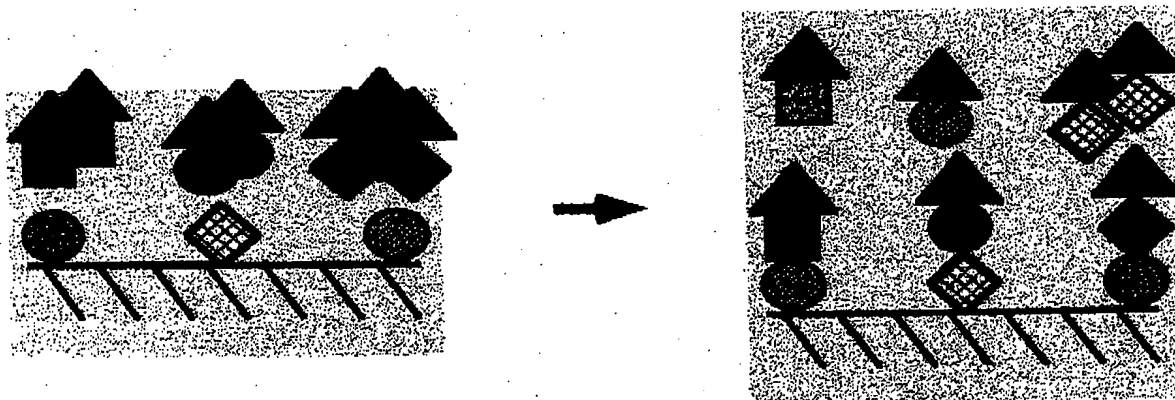
Nachteile des spottens von Monomeren

Anforderungen an das spotten von Farbe:



- niedrige Diffusionsrate der großen Chromophoren
- schnell verdunstendes Lösungsmittel
- saugfähiges Papier

Anforderungen an das spotten von Monomeren für die kombinatorische Synthese:



- hohe Diffusionsrate der kleinen Monomere
- sehr langsam verdunstendes Lösungsmittel
- Träger mit möglichst glatter Oberfläche

Abb. 20
Fig. 20

Nachteile der lithographischen Synthesen

N X

1 X

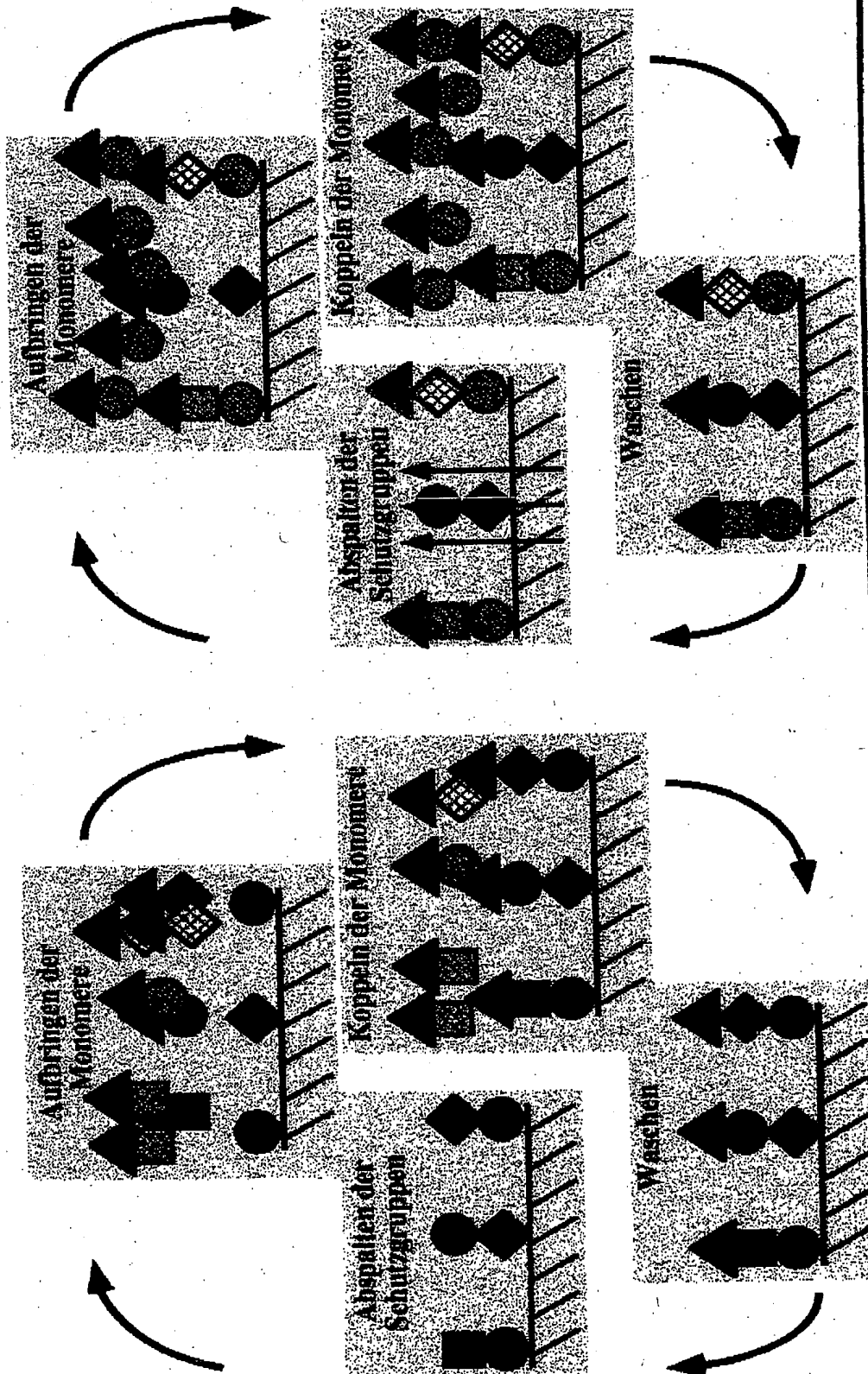


Abb. 21 Abb. 21

konfokaler Laser zum Auslesen der Fluoreszenzsignale

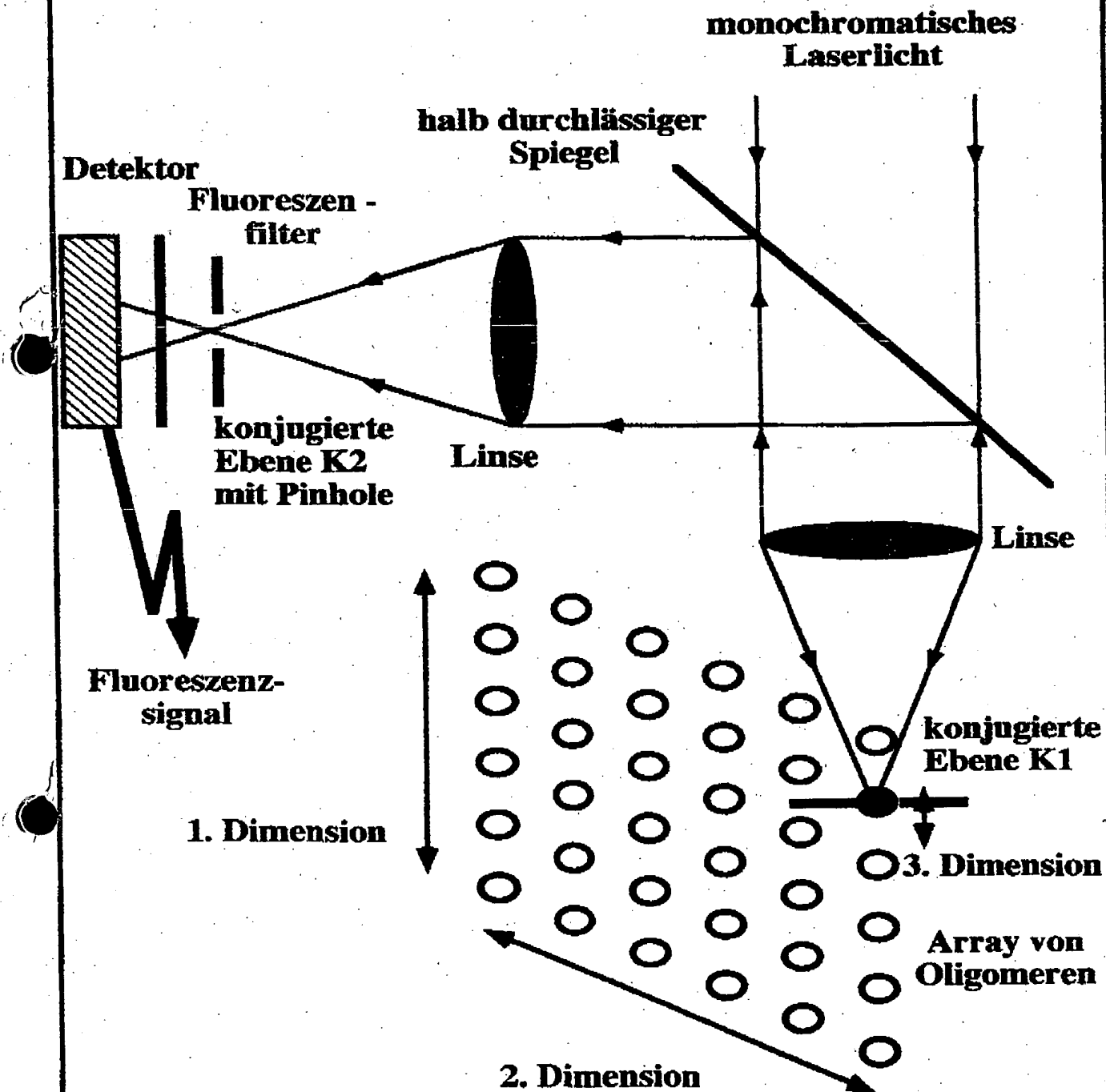
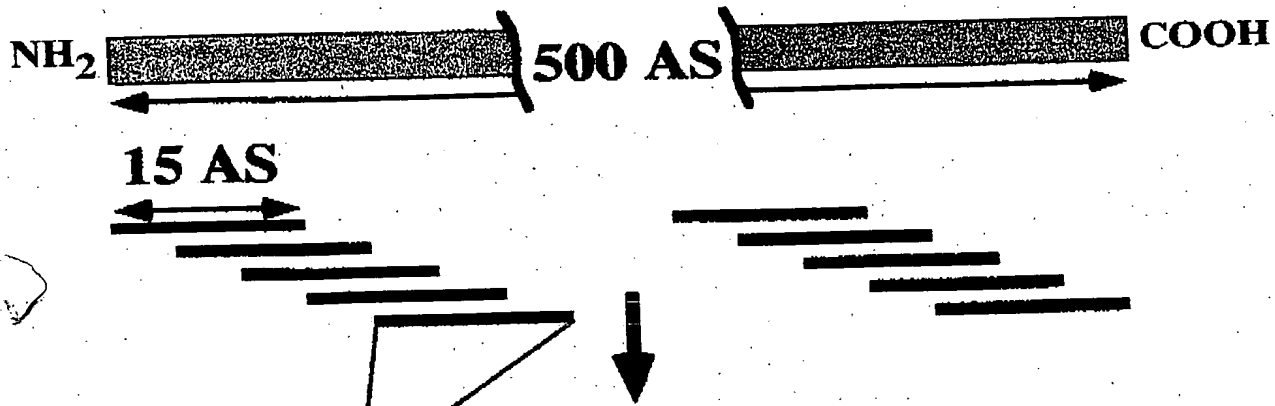


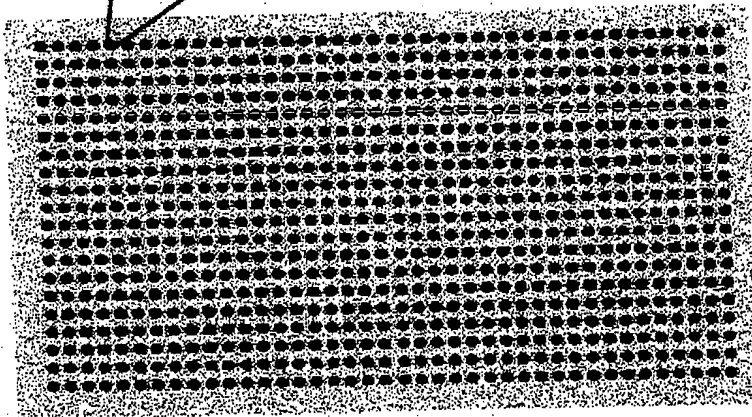
Abb. 22
100.25

Array von Genprodukten

ein durchschnittliches Gen des Menschen codiert ca 500 Aminosäuren



Gen 1
Gen 2
Gen 3
Gen 4
Gen 5



benötigte Peptide pro Gen (ca 500 AS):
= ca 100 x 15mere (je 5 AS versetzt)

Zahl der menschlichen Gene:
= ca 100.000

benötigte Peptide, um alle Gene abzudecken:
= 100 x 100.000 = ca 10 millionen

Abb. 23

Abb. 23

Anwendungen für das Array von Genprodukten

1. Epitopbestimmung von monoklonalen Antikörpern
2. Serumprofil von Autoimmunpatienten
3. Serumprofil von Patienten mit Krankheiten unbekannter Ursache
4. Serumprofil von Krebspatienten
5. Suche nach Interaktionspartnern
 - a. von menschlichen Genprodukten
 - b. von Pathogenen (z.B. von viralen Genprodukten)

Gen 273;
Epitop(7-22)

Gen 1
Gen 2
Gen 3
.
.
Gen xy

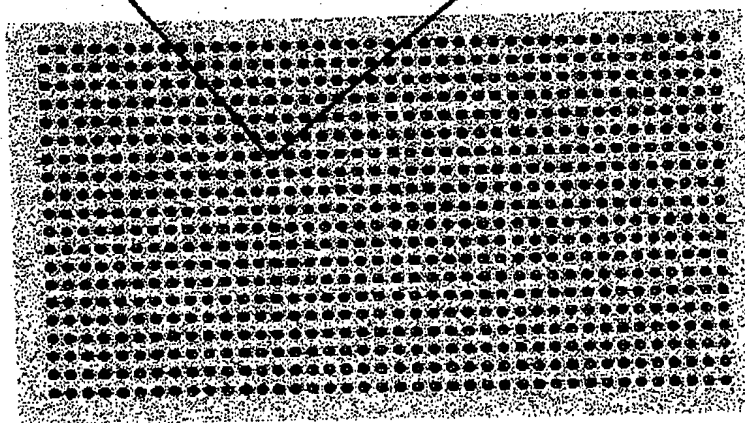


Abb. 23x
Fig. 23x

Vollständige Peptidbibliotheken

Synthese von Decamergemischen mit einzelnen festgelegten Aminosäurenpositionen:

N = festgelegte Position

X = Gemisch von Aminosäuren



vollständige Tripeptidbibliothek:

= $20^3 = 8.000$ verschiedene Peptide



vollständige Tetrapeptidbibliothek:

= $20^4 = 160.000$ verschiedene Peptide



vollständige Pentapeptidbibliothek:

= $20^5 = 3,2$ millionen verschiedene Peptide



vollständige Hexapeptidbibliothek:

= $20^6 = 64$ millionen verschiedene Peptide

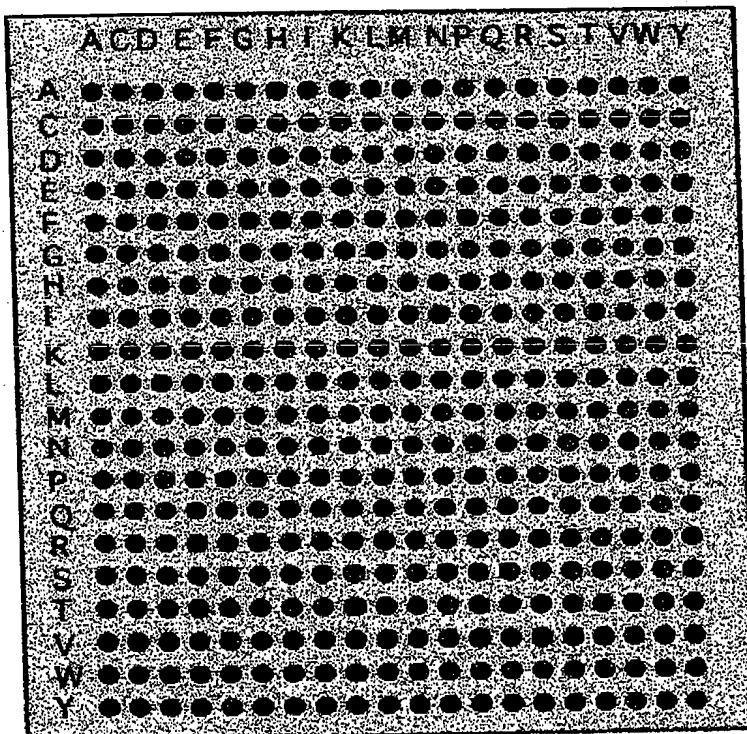
Abb. 24

Korrelation von Krankheit mit Peptidmuster

**Färbung einer vollständigen
Pentamerbibliothek mit Serum:**

a. Kontrollseren

b. Patienten mit Magengeschwüren



Blaue Färbung:

Peptide, die von allen Seren erkannt werden

Rote Färbung:

**Peptide, die nur vom Serum von Patienten mit
Magengeschwüren erkannt werden**

Abb. 25

Abb. 25

Anwendungen für das Array einer Penta oder Hexamerbibliothek

- 1. Epitopbestimmung von monoklonalen Antikörpern**
- 2. Auffinden von diagnostischen Markern durch Korrelation des Serumprofils mit der diagnostizierten Krankheit**
- 3. Serumprofil zur parallelen Diagnose von Krankheiten**
 - a. von Autoimmunkrankheiten**
 - b. von Infektionskrankheiten**
 - c. von Krebserkrankungen**
 - d. von Allergien**
 - e. von Krankheiten unbekannter Ursache**
- 4. Suche nach Interaktionspartnern**
 - a. von menschlichen Genprodukten**
 - b. von Pathogenen (z.B. von viralen Genprodukten)**

Epitop:
XXXAGNTSXXX

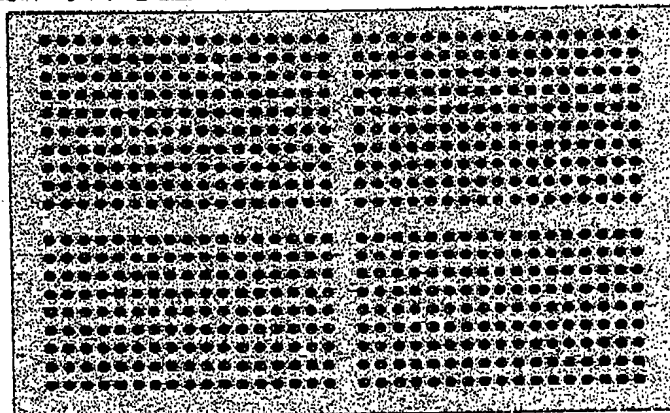


Abb. 25x

100x

Suche nach Enzyminhibitoren

Die Bindung einer Protease an eine vollständige Pentamerbibliothek aus D-Aminosäuren:

Blaue Färbung:

**Peptide, an die die Protease binden kann
(nachgewiesen durch einen monoklonalen
Antikörper)**

Grüne Färbung:

**Enzymreaktion der gebundenen Protease mit
farbig markiertem Peptidsubstrat**

Rote Färbung:

gebundene Protease ohne Enzyaktivität

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	M	N	P	R	S	T	V	W	Y
A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
D	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
E	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
F	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
H	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
I	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
K	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
L	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
M	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
N	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
P	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Q	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
R	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
S	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
V	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
W	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Y	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	M	N	P	R	S	T	V	W	Y
A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
D	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
E	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
F	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
H	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
I	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
K	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
L	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
M	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
N	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
P	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Q	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
R	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
S	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
V	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
W	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Y	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

Abb. 26

766

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

Certificate of Priority DE 199 35 553.3 of Filing of a Patent Application

File No.: 199 35 553.3

Filing date: July 30, 1999

Applicant/Owner: Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung
des öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg/DE

Title: Combinatorial peptide synthesis with the aid of a laser
printer

IPC: C 07 K 17/12

**The attached documents are a true and accurate reproduction of the parts of
the original documents of this patent application filed on July 30, 1999,
irrespective of possible colour differences due to copying.**

Munich, July 29, 2010
German Patent and Trade Mark Office
The President
by order

Hauck

COMBINATORIAL PEPTIDE SYNTHESIS WITH THE AID OF A LASER PRINTER

SUMMARY

The aim of the proposed method is the combinatorial synthesis of an array of as many as possible peptides, packed as closely as possible, on a support. The novelty of this method is the use of a laser printer to bring different monomers, as closely packed as possible, onto the support. A laser printer operates as follows:

1. The toner used consists of small polystyrene beads having a magnetic fraction
2. The toner particles adhere to a magnetic roller as a result of the magnetic fraction
3. A selenium roller is written by switching on and off a laser which partially discharges the selenium roller.
4. In those places where the selenium roller is definitely discharged, the toner particles can jump onto the selenium roller from the magnetic roller due to electrical forces of attraction
5. From the selenium roller the toner particles jump onto the paper or a copier film and
6. are fused by a hot roller

Completely analogously to the normal toner, an "amino acid toner" was produced in which instead of the chromophores, amino acids protected with a protective group are incorporated in solid particles at room temperature. The equivalent of the solid polystyrene particles of the normal toner at room temperature is in this case diphenylformamide

having a melting point at around 71°C. According to the above-described principle of the laser printer, these particles can be printed on a support in a defined manner and in addition linked to a support.

Evidence of the principle was provided by synthesis of a peptide using a laser printer, wherein the synthesised peptide could be detected with the aid of a monoclonal antibody.

In order to transfer the immense number of pixels that can be resolved by a laser printer into a similarly large number of peptides, the prototype of a peptide synthesiser is constructed, its key element consisting of a colour laser printer. Modern colour laser printers allow the exact spatial assignment of four colours which can be extended in a relatively simple intervention to 20 or more different toners. This spatial assignment can be retained very simply even for the successive layers of imprinted amino acids if, before imprinting the respectively next layer of amino acids, a linking reaction takes place on the support fixed relative to the selenium roller.

There are numerous applications for highly complex peptide arrays, for example, about 10 million 15mers on a filter can represent all human gene products. The serum profiles thus obtained allow conclusions to be drawn on autoimmune diseases, cancerous diseases and possibly also diseases of unknown cause. Such an array also helps in the search for interaction partners, for example of viral gene products.

Note:

The "selenium roller" now no longer contains any selenium, but a laser-writable organic material.

COMBINATORIAL PEPTIDE SYNTHESIS WITH THE AID OF A LASER PRINTER

The Principle of Combinatorial Synthesis

The aim of the proposed method is the combinatorial synthesis of an array of as many as possible peptides, packed as closely as possible, on a support. The principle of combinatorial synthesis is shown schematically in **Figure 3**. All methods of combinatorial synthesis have in common that an, in principle almost unlimited, number of different oligomers (= molecule library) can be synthesised with the aid of a small number of different monomers. This is accomplished by a repetitive process in which:

1. Monomers are applied to the support
2. The different monomers are linked to the support (these have a protective group so that a plurality of molecules cannot be linked successively)
3. The non-linked molecules are washed away
4. The protective groups are cleaved and
5. The next cycle begins with the renewed application of monomers to the support.

Depending on the number of different molecules, combinatorial synthesis gives an astronomical number of possible combinations, even with relatively short oligomers. For example, if peptides are to be produced by combinatorial linking of amino acids, there are $20^2 = 400$ different peptides, $20^4 = 160,000$ different tetrapeptides or $20^6 = 64,000,000$ different hexapeptides (**Figure 4**). Thus, the packing density ultimately determines the complexity of the synthesisable molecules.

What & why?

Thus, for example, all human gene products can be brought onto such a filter as a array of overlapping peptides (**Figure 23**). If we synthesise 15mers which overlap with the neighbouring peptides by respectively 10 amino acids, about 10 million peptides are required for this. This array can then be used, for example, to create epitope profiles (**Figure 23x**):

1. of monoclonal antibodies
2. of patient sera
 - a. of autoimmune patients
 - b. of diseases suspected to have an autoimmune component
 - c. of cancer patients
 - d. but possibly also of other diseases such as heart attack, stroke

==> these possibly also have an autologous titre against body's own proteins
3. Another possibility is the search for interaction partners
 - a. of human proteins amongst one another
 - b. or with gene products of pathogens, e.g. with viral gene products
 - c. with defective gene products compared with intact gene products

TECHNICAL CHARACTERISTICS OF THE METHOD

- COMPARISON WITH OTHER METHODS
- MODIFICATIONS/IMPROVEMENTS IN THE FUTURE

Technical characteristics

The laser printer used in the following experiments has a resolution of printed dots of 600 dpi (dots per inch). This corresponds to a diameter of imprinted individual pixels of about 40 μm or such a laser printer places about 4500 x 7000 dots in each normal printing process per Din A4 page (about 20 x 30 cm). This in turn corresponds to about 30 million dots per Din A4 page (**Figure 14**).

Figure 10b shows that this high resolution in a normal printing process can be "harvested" almost free from error and reproducibly. In fact the highest magnification of **Figure 10b** shows no single wrongly placed pixel.

Therefore about 5 million dark spots must be accommodated separately from one another on a Din A4 page if respectively one pixel is left blank thereabouts. However, this is certainly far from the end point of a clearly meteoric technological development. The laser printers which can already be purchased, having a resolution of 2,400 dpi, place about 500 million pixels per Din A4 page whereby about 80 million dark spots can be accommodated separately on a Din A4 page.

Reading out the pixels is not a particularly great problem since commercially available cheap and rapid scanners are now available, reaching a resolution of 4800 dpi or better. All these devices will certainly be improved continuously in the coming years, where the predicted limit of the resolution will lie in the range of the wavelength of light. The proposed method will also ride along with the wave of development resulting in high-resolution laser

printers and scanners, so that in the next few years a continuously improved packing density of the molecule libraries which can be synthesised can be expected.

Status of Research

Comparison with other commonly used methods for combinatorial synthesis

1. Comparison with lithographic syntheses

The next few diagrams show schematically some commonly used methods for combinatorial synthesis. The name of the company Affymetrix stands in particular for lithographic synthesis methods. These are shown in **Figure 19A and 19B**. In this method the synthesis site is made accessible to activated monomers by the action of light (**Figure 19A**) or light-sensitive protective groups are cleaved (**Figure 19B**), whereby a locally definable chain lengthening is made possible.

The two lithographic methods (**Figure 19A & 19B**) achieve a hitherto unrivalled resolution of the individual dots but clearly do not provide the efficiencies and the quality of the proven standard syntheses for oligonucleotides or even for peptides.

The first publications of Affymetrix were also concerned with peptide synthesis and so far very little has appeared subsequently. For the most part subsequent publications were concerned with oligonucleotide synthesis.

In small part this may be due to the somewhat different chemistry, which involves the use of light-labile protective groups. This chemistry has certainly not yet been as optimised as the standard fmoc chemistry.

However, there is another more important fundamental reason for this, which is shown schematically in **Figure 21**. In all

printing methods, an entire layer of different monomers is always applied to the support which then all together run through a linking cycle before the next layer of monomers is imprinted. In the lithographic synthesis technique shown in **Figure 19A & 19B**, on the other hand, each type of monomer must be successively applied individually, linked and excess monomers washed away. This means that for the synthesis of the same array of oligomers, the lithographic synthesis methods must run through N times more linking cycles than are required in the printing method (**Figure 19C & 19D**). The number N stands for the number of different monomers, i.e. for the synthesis of an array of oligopeptides the lithographic syntheses require 20x more linking cycles compared with the printing method. As a result, the error rate in the synthesis is naturally increased enormously or the quality of the end product shows deterioration.

The current standard technique of peptide synthesis therefore allows the synthesis of peptides of 100 amino acids length after a fashion, which means that the lithographic synthesis methods shown already have very serious quality problems in the synthesis of an array of pentapeptides. This is probably the reason why the lithographic methods have so far only been used for the synthesis of oligonucleotide arrays, since only four different monomers need to be linked to the support in this case.

Another side effect is the comparatively poor chemical yield of the lithographic methods, since for each individual linking reaction, the entire support must be uniformly covered with the reactive monomers.

In addition, the lithographic methods used so far have another problem since they use the principle of the confocal laser microscope for reading out their signals.

They therefore need to scan all three dimensions in order to find the desired signal which is very slow compared with a scanner for example (**Figure 22**). For this reason, from a certain level of complexity on the slow readout speed constitutes a problem for these systems.

2. Comparison with other printing methods

Two printing methods for combinatorial synthesis are juxtaposed in **Figure 19C** and **19D**. The method shown schematically in **Figure 19C** corresponds to the method newly presented here whilst the method shown in **Figure 19D** represents the various commonly used printing methods with printing fluids (spotting, ink jet printer, screen printing etc.).

The following sections discuss the advantages afforded by using a laser printer in peptide synthesis compared with the other commonly used methods.

Combinatorial syntheses in which the individual monomers are spotted above and adjacent to one another or even applied to the support with an ink jet printer (**Figure 19D**) have already been in common use for some years. Although an ink jet printer creates a resolution completely comparable to the laser printers, this resolution can so far obviously only be "harvested" very inadequately for the combinatorial syntheses. This reason for this lies in the mutually opposing requirements when printing a support with ink or with monomers for combinatorial synthesis (**Figure 20**).

The brilliance of the prints from ink jet printers is achieved by keeping the diffusion of different ink particles as small as possible. This is accomplished by the enormous size of the ink particles compared with the monomers and by the fact that the imprinted toner fluid contains rapidly volatile substances so that the ink

particles are precipitated very rapidly. In addition special highly absorbent high-gloss papers were used.

These papers mostly having a highly complex structure are not generally suitable as supports for a molecule library and also the two other points contradict the requirements for the linking to a molecule library which is as closely packed as possible:

1. The monomers are very much smaller than the imprinted colour chromophores, merely this fact increases the diffusion rate enormously.
2. Not only must the imprinted monomers not be dissolved in readily volatile solvents, on the contrary it is scarcely feasible to find a solvent which does not vaporise too rapidly in the desired quantities in the nanolitre range since the concentrations of the linking partners would thus change in an undesirable manner since the linking reaction to the support needs a certain time.

This is the reason why all the spotting methods used hitherto are prone to error and expensive as soon as they advance into smaller dimensions. In these dimensions there is always the risk that the applied spots will run, spray away, the monomers will diffuse too far or the solvent will partially or completely evaporate.

Compared with this, printing using a laser printer is a very robust and error-tolerant method.

Presentation of the new method

Principle of a laser printer

The novelty of the method proposed here is the use of a laser printer to bring different monomers, as closely packed as possible, onto the support. **Figure 5** explains the functional principle of a laser printer:

1. The toner used consists of small polystyrene beads having a magnetic fraction
2. The toner particles adhere to a magnetic roller as a result of the magnetic fraction
3. A selenium roller is written by switching on and off a laser which partially discharges (or partially charges) the selenium roller.
4. In those places where the selenium roller is definitely discharged, the toner particles can jump onto the selenium roller from the magnetic roller due to electrical forces of attraction
5. From the selenium roller the toner particles jump onto the paper or a copier film and
6. are fused by a hot roller

A characteristic feature of the laser printer is therefore that dry toner particles are used, whose ingredients do not diffuse. The particles are solid at room temperature and are only briefly fused by a hot roller (**Figure 5, No. 6**). As a result they are then fixed on the paper.

Modern laser printers, in particular colour laser printers, thereby achieve a brilliance of the print which almost approaches photo quality. This brilliance reflects an extremely low error rate when transferring the toner particles to the selenium roller. An explanation for this is provided by the basic physical forces: electrostatic attraction or repulsion are, at least in these dimensions, the strongest known forces in physics.

Support for the peptide library

Firstly, a support is required to which the activated amino acids can be linked. Such a support is already known: Ronald Frank at the GBF in Braunschweig has developed a method for the derivatisation of quite normal paper with free amino acids (**Figure 6**) to which fmoc protected amino acids can then be linked using the standard chemistry usually used for peptide synthesis (Tetrahedron Letters (1990) 31(12) pp 1701).

This method is used commercially by several firms as "SPOT synthesis of peptides" (i.a. by Jerini Biotools in Berlin).

The method developed by Ronald Frank also makes it very simple to check whether linking of the applied amino acids to the support has taken place. For this the free amino groups newly formed after cleaving the N-terminal protective group are detected with bromophenol blue which does not bind covalently to these (**Figure 7**).

Firstly, as described in **Figure 6**, the paper is derivatised with a layer of N-terminal protected amino acids and then the N-terminal fmoc protective groups are cleaved. The initially free amino groups shown green in **Figure 7A** are then formed. A second layer of fmoc protected amino acids is then linked thereto, Before the cleaving of the N-terminal protective groups, this time the non-reacted free amino groups are esterified with acetic acid anhydride (coloured red in **Figure 7A**) so that after cleaving the protective groups, only free amino groups can be detected where a linking to the support had taken place previously. In **Figure 7B** these are intensely blue coloured regions where the second layer of amino acids was linked to the support. In the lighter regions, on the other hand are the free amino groups originating from the first layer of amino acids which have been esterified with acetic acid anhydride.

Production of an "amino acid toner"

In an "amino acid toner", amino acids provided with a protective group are incorporated in particles which are solid at room temperature. The aim here is that these particles can then be printed onto a support in a defined manner using the principle of the laser printer described above. In order to achieve this, the particles in the laser printer must be able to jump from roller to roller (see **Figure 5**), i.e. they should be electrically chargeable.

Furthermore, for combinatorial peptide synthesis it must be possible for the amino acids contained therein to be "made mobile" from the solid matrix material since only then can they link to a support. These criteria are satisfied by the "amino acid toner particles" shown in **Figure 8**:

1. The equivalent of the polystyrene beads of the normal toner which are solid at room temperature is diphenylformamide having a melting point at about 71°C.
2. The magnetic fraction is contributed by magnetite particles in both cases.
3. Instead of chromophores the "amino acid toner" contains the activated amino acids provided with an N-terminal protective group.

The criterion for the selection of diphenylformamide as "solid solvent" at room temperature is its structural similarity to dimethylformamide which is used for standard peptide synthesis. Apart from the different aggregation states at room temperature, no large differences in the chemical behaviour can thus be expected.

In precisely the same way as the normal toner, the "amino acid toner" can be fixed by means of a hot roller wherein the fmoc amino acids used for the standard synthesis can briefly readily withstand 150 °C. Instead of by heat, the N-terminally protected amino acids contained therein can also be "made mobile" at room temperature with the aid of a solvent such as dichloromethane, i.e. link to the derivatised support. This can even be accomplished by supplying dichloromethane vapour.

Both diphenylformamide and also magnetite do not disturb the linking of the fmoc amino acids to the support (**Figure 9 and 11**). In **Figure 9** the fmoc amino acids were dissolved in DPF and spotted whilst in **Figure 11** an "amino acid toner" was imprinted and then the N-terminally protected amino acids contained therein were linked to the support.

Small, as far as possible uniform (about 5 µm), particles must be produced from the components of the "amino acid toner" (magnetite, diphenylformamide and the respective amino acids provided with fmoc protective groups) since the transfer of the particles from the magnetic roller to the selenium roller is substantially determined by the ratio of charge to mass. All the "amino acid toners" shown here were produced with the aid of a coffee grinder, poured into a toner container and then printed onto paper in a laser printer.

A comparison of the print quality of the normal purchasable toner with the various "amino acid toners" reveals a resolution of about 40 µm for the normal toner (**Figure 10b**) whilst for the tested, very primitively manufactured "amino acid toners" compared with the prior art, the imprinted structures could be clearly distinguished from one another from a size of about 120-200 µm (**Figure 10**).

Linking of imprinted fmoc amino acids

Figure 11B shows that the amino acids imprinted with a laser printer can link to the support. Firstly, the paper is derivatised for this with free amino groups as described above. The initially free amino groups shown green in **Figure 11A** are thereby formed. Then the "amino acid toner" is imprinted and the fmoc protected amino acids contained therein are linked to the free amino groups shown green in **Figure 11A**. The non-linked fmoc amino acids are washed away and the remaining free amino groups are esterified with acetic acid anhydride (shown red in **Figure 11A**). The fmoc protective groups of the spotted second layer are then cleaved and the newly formed free amino groups are detected with bromophenol blue. The ensuing blue pattern this time reflects the sites at which the second layer of amino acids was imprinted.

Pre-activated fmoc amino acids

Preference should be given to pre-activated fmoc-protected amino acids since these give better linking efficiencies compared with norm fmoc-protected amino acids having a free carboxy terminus. **Figure 18** shows schematically the reason for this:

amino acids having a free carboxy terminus are imprinted on the support and must then be activated by an activator and a base. This results in a reactive ester (**Figure 6, No. 2**) which then reacts with the free amino groups of the support.

However, if the activator is present in excess, there is additionally an undesirable side reaction: the activator additionally links to the available free amino groups of the support, the number of the available free amino groups decreasing with each synthesis (**Figure 18**).

Unlike standard peptide synthesis, it is very difficult to exactly tare the molarities of the fmoc amino acids applied

to the support, the activator and the base, so that the printing of pre-activated N-terminally protected amino acids can be used to solve this problem.

Instead of fmoc amino acids, for example, the corresponding anhydrides can be used, but these are about five times more expensive compared with the normal fmoc protected amino acids. **Figure 11** shows that this method functions in principle: an anhydride of fmoc alanine was printed on the support and linked. The fact that this linking was successful is shown by the clear blue colour of the printed pattern (**Figure 11**).

Synthesis of a peptide with the aid of imprinted fmoc amino acids (proof of principle)

In the next experiment two different peptides are synthesised in a chequered fashion on a support of derivatised paper (**Figure 12**). Firstly the "amino acid toners" corresponding to the amino acids shown coloured in **Figure 12** are produced as described above (see **Figure 10**). The amino acids marked by a coloured circle in **Figure 12** are imprinted in a regular pattern of ovals whilst the amino acids marked by a coloured rectangle are printed as a second pattern of regularly arranged rectangles. Both patterns intermesh in a chequered fashion.

The corner SPOTs correspond the peptide *N-Terminus* DYKDDDDK...*C-Terminus* which is recognised by the mouse monoclonal antibody anti-FLAG M1 calcium dependent (1 mM CaCl_2) whilst the round SPOTs correspond to the peptide *N-Terminus* DDEETTDK...*C-Terminus*. Some strips with the peptides arranged in a chequered fashion are incubated with milk powder to block the non-specific binding sites and then stained with mouse monoclonal antibody anti-FLAG M1 and for control with an actin-specific monoclonal antibody.

In **Figure 13B**, particularly on the front of the derivatised paper, it is possible to identify a grey pattern originating from the imprinted magnetite particles which could not be completely washed away. The imprinted ovals or rectangles can be clearly identified, corresponding to the site of the peptide synthesis described above.

In **Figure 13B** a clear specific reaction of the anti FLAG M1 antibody can be seen, corresponding to the rectangular synthesis sites of the FLAG peptide *N-Terminus* DDEETTDK...*C-Terminus*. A control antibody does not stain this peptide.

This shows that combinatorial peptide synthesis using a laser printer is possible in principle and that the "amino acid toners" required for this can be produced. The fmoc protected amino acids contained in the "amino acid toners" can clearly link to the support after the printing.

Superimposed printing of the amino acid toners five times was sufficient to ensure a distinct specific staining even of the smaller rectangles, so that approximately 10,000 peptides per Din A4 page can be synthesised using this technique with these adjuvants.

Building of a prototype

In order to actually be able to harvest the enormous potential of a laser printer just described for combinatorial synthesis, the quality of the "amino acid toner" must first be improved. The "amino acid toners" produced so far fairly primitively with a coffee grinder presently give a resolution of about 200-300 μm , i.e. individual SPOTs having a spacing of about 300 μm can be clearly distinguished from one another after a printing process (**Figure 10**). When projected, this means that about 300,000 SPOTs could be accommodated on a Din A4 page with the proposed method.

For a successful combinatorial peptide synthesis in this order of magnitude, however, another requirement must be satisfied: several layers of "amino acid toners" must be able to be printed one above the other as exactly as possible.

Precise superimposed printing

The peptide synthesis shown in **Figure 13** was carried out using a normal black and white laser printer which draws in the paper correct to about 1 mm. This paper drawing-in accuracy therefore only makes it possible to synthesise about 10,000 peptides per Din A4 page. Therefore, in addition to optimising the "amino acid toner", the most accurate possible superimposed printing of different layers of fmoc amino acids is a further basic requirement for "harvesting" the immense number of pixels placed by a laser printer.

Two ways of achieving the accurate superimposed printing of several toner layers will be shown in the following. The cornerstone of both methods is the use of a colour laser printer (**Figure 15**).

Most colour laser printers use the solution shown in **Figure 15** to place their four different inks exactly adjacent to one another. They use two large rollers which are mechanically exactly intercoupled. On one roller the laser writes the electrostatic image of the first colour, then the ink particles jump over from a magnetic roller onto the parts written by the laser and are transferred to the paper that is firmly fixed on the second "support roller". These ink particles are fixed there whilst the laser writes the electrostatic image of the second, then of the third and the fourth colour. Since the paper is fixed on the "support roller" over the entire time, the spatial

assignment of the colours to one another agrees very exactly ($< 1 \mu\text{m}$ deviation). Only when the last toner layer has been transferred to the paper is the fixing on the "support roller" released.

This method ensures that different toner particles are printed spatially exactly adjacent to one another or in the case of mixed colours, one above the other. It can also be extended relatively easily to 20 or more different toner particles. For this, the interchangeable drum which in the colour laser printer brings the four different colour toners with the respective magnetic rollers to the selenium roller, only needs to be replaced by an interchangeable drum having 20 or more different toner containers.

In exactly the same way as the functioning of the colour laser printer during colour printing, this would make it possible to apply a layer with all 20 different amino acids spatially exactly to the support. However, if the fixing of the derivatised paper (or another support for the peptide library) on the "support roller" is then released, the exact position information is lost since this is caused by the coupling of the "support roller" to the selenium roller (and therefore with the position of the laser).

One possibility of dealing with this problem consists in maintaining the fixing of the support to the "support roller" during the entire peptide synthesis. This means that all the synthesis cycles, including all washing steps and the supply of various linking reagents must take place on the "support roller".

Figure 15b therefore shows schematically a type of peptide synthesiser with a colour laser printer as the key element. Unlike a normal colour laser printer (**Figure 15**), in **Figure 15b** the hot roller (No. 6) has been replaced by a device which can bring linking reagents or washing

solutions in the gaseous or liquid state in contact with the rotating "support roller". Gaseous substances are supplied with the aid of a broad nozzle (not shown) whereas liquids are brought in contact with the molecule library support fixed on the "support roller" by means of an endless belt.

The second method, which results in the exact superimposed printing of several toner layers is shown in **Figure 16**. In this method, the peptide synthesis is not carried out directly on the "support roller", instead the part of the colour laser printer is restricted to printing the "amino acid toner". Synthesis and washing cycles for the peptide synthesis take place outside the colour laser printer.

In order to be able to nevertheless exactly superimpose the individual toner layers, some feedback is required in this method whereby a pattern applied to the support is scanned by a scanner unit which identifies and electronically corrects any deviation (including distortions inside the support). This electronic correction does not require mechanical parts since each stored pixel can simply be assigned a vector which shifts the laser and, with this the corresponding toner particle, exactly by the correction amount of this vector.

A combination of this second method with the first method is particularly suitable if particularly close-packed peptide libraries are to be synthesised or if an "on-line" quality control of the individual synthesis layers is used. In this case the intensity of the blue colouration can be checked with aid of the scanner unit spot-for-spot and layer-for-layer by means of bromophenol blue, and therefore after each individual synthesis step, the quantity of newly-formed free amino groups after cleaving the fmoc protective groups can be determined. Instead of the blue colouration with bromophenol blue, the characteristic

absorption of the fmoc protective group can naturally also be detected.

Other supports for the molecule library

In order to be able to harvest the large number of possible pixels (= ultimately at different peptides), another requirement must be satisfied. The support film should distort as little as possible. Not all types of paper are the first choice, but paper can also be replaced by copying films. These consist of polystyrene which in turn is the standard support material in classical peptide synthesis. Another advantage of polystyrene films is their transparency, which is advantageous in many detection systems.

Application examples

The proposed method can have many applications in combinatorial chemistry or in the synthesis of oligonucleotides. However, the following three examples are restricted to the synthesis of peptides. These examples are based in particular on the method shown in **Figure 15b**, whereby it is possible to cost-effectively produce arrays with millions of peptides. All three examples describe a few standardised products, for which there are many possible applications.

Three examples for the application of peptide arrays

1. Synthesis of Unigene product filters

A human has about 100,000 genes which on average, encode somewhat less than 500 amino acids. In a few years, over 90% of these genes will be known. If each of these gene products is covered by an average of 100 overlapping 15er peptides which are mutually shifted by 5 amino acids, about

10 million different peptides will be required to cover all human gene products. Such a filter is shown schematically in **Figure 23**. Possible intermediate aims are expression arrays which each cover only a part of the human gene products, e.g. "oncogene arrays", "immunology arrays" etc.

These filters are the starting part for many experiments (**Figure 23x**):

1. Epitope determination of monoclonal antibodies
2. Analysis of the serum of autoimmune patients (e.g., in cases of rheumatism)
==> which epitopes are recognised?
3. Analysis of the serum of patients having patients diseases with hitherto unknown causes
==> for example, are multiple sclerosis or Parkinson's disease autoimmune diseases?
4. Analysis of the serum of cancer patients
==> which epitopes are recognised?
(cancer patients probably have a titre against body's own antigens)
5. Search for interaction partners
==> to which peptides do various HIV gene products bind?

Synthesis of a complete tetra or pentapeptide library with the final aim of a complete hexapeptide library

The reaction of antibodies in blood serum with antigen has been used for the diagnosis of diseases for very many years. A large proportion of the repertoire of estimated $> 10^8$ antibodies possessed by a human can bind to small penta or hexapeptides, so that the presence of very many

different antibodies in blood serum can be detected simultaneously by the binding to a complete penta or hexapeptide library (**Figure 24**).

Different groups of antibodies reflect the immune response of a patient to different pathogens or disease states such as autoimmune diseases, allergies, possibly also diseases such as stroke or heart attack. In addition, cancerous diseases clearly also correlate with the occurrence of specific antibodies in the patient's blood serum (see, in particular, the studies of the group of Prof. Pfreundschuh from Homburg an der Saar).

As in the first example, the aim in this case is also the detection of partial patterns of binding events which correlate with clinical pictures (**Figure 25x**). Partial patterns once identified in turn enable the parallel diagnosis (or exclusion) of very many different diseases.

The greater the complexity of the peptide library, the more reliably a pattern of peptide-specific antibody reactivities can be reproducibly assigned to the patient serum. Partial patterns that are similar to one another reflect a similar (disease) prehistory. Consequently this method is also suitable for finding diagnostic markers which in turn can be used for the parallel diagnosis of many different diseases with the aid of a single standardised product.

It is really exciting if a pattern of binding events correlates with diseases for which it is not known so far what their cause is, since this makes it possible to draw conclusions on the cause (or hitherto unknown accompanying circumstances) of the disease. Candidates for such a procedure are, for example, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, heart attack, stroke and many more.

This principle can be tested with the serum of patients having gastric ulcers. In this case, peptides should be identified which find their correspondence in the genome of *Helicobacter pylori* (**Figure 25**).

3. Synthesis of D-peptide filters

In the third example, an accelerated search for lead structures for therapy is made possible by the technique described above. As described in the second example, arrays of complete peptide libraries are synthesised which this time, however, are not synthesised from the naturally-occurring L-amino acids but from their mirror images, the D-amino acids. D-peptides are suitable as potential therapeutic substances since we humans do not have the enzymes for breaking these down.

In **Figure 26** such an array of D-peptides is stained with a protease which is detected with a monoclonal antibody (blue colouration). As a result, binding modules can be identified having the capability of specifically binding this protease.

If enzyme evidence is available for the activity of this protease, the peptide-bound protease can also be detected thereby. If peptides which bind the enzyme but simultaneously block its activity are now found when comparing the two staining patterns, with these we therefore have the building blocks for a potential therapeutic substance to hand.

Description of the figures

Figure 3

Combinatorial synthesis:

- Monomers are applied to the support
- The different monomers are linked to the support
- The non-linked monomers are washed away
- The protective groups are cleaved
- Monomers are again applied to the support and the next cycle begins

Figure 4

Complexity of combinatorial peptide libraries

Figure 5

Functional principle of a laser printer:

- 1: Toner particles consist of small polystyrene beads having a magnetic fraction
- 2: The toner particles adhere to a magnetic roller as a result of the magnetic fraction
- 3: A laser partially discharges the selenium roller (by switching on and off)
- 4: The toner particles jump from the magnetic roller to the selenium roller as a result of electrical attraction forces
- 5: From the selenium roller the toner particles jump onto the paper or a copying film and
- 6: Are fused by a hot roller

Figure 6

Paper derivatised with amino groups:

The carboxyl group of N-terminally protected amino acids is activated and then linked to the free hydroxyl groups of paper. After cleaving the fmoc protective group, free amino groups are formed on the paper which can be detected by the non-covalent binding to bromophenol blue.

Figure 7

SPOT synthesis:

Paper is derivatised with a first layer of fmoc protected amino acids, non-linked fmoc amino acids are washed away and the fmoc protective groups of the first layer are cleaved with base.

A second layer of fmoc protected amino acids is spotted onto defined sites, the non-linked fmoc amino acids are again washed away and the remaining free amino groups are esterified with acetic acid anhydride.

The fmoc protective groups of the spotted-on second layer are then cleaved and the resulting free amino groups are detected with bromophenol blue.

The resulting blue pattern reflects the sites at which the second layer of amino acids was spotted-on (Figure 7b).

Figure 8

Schematic comparison of the particles of a normal toner with and "amino acid toner":

- The equivalent of the polystyrene beads of the normal toner which are solid at room temperature is diphenylformamide having a melting point of about 71 °C.
- In both cases the magnetic fraction is contributed by magnetite particles.
- Instead of the chromophores, the "amino acid toner" contains the activated amino acids provided with an N-terminal protective group.

Figure 9

The linking to the support functions in the presence of diphenylformamide (DPF) just as well as in the presence of 1-methyl-2-pyrrolidone (NMP):

Amino acids with an N-terminal fmoc protective group are dissolved in DPF or NMP and spotted onto derivatised paper.

Then, the activator HBTU (1-H benzotriazole 1-yl 1,1,3,3 tetramethyluronium hexafluorophosphate), dissolved in NMP, is spotted thereover and the reaction is started by adding three different bases. After 30 min at 65 °C the non-linked amino acids are washed away and remaining free amino groups are esterified with acetic acid anhydride. The free amino groups newly formed after cleaving the fmoc protective group are detected with bromophenol blue.

Figure 10

Comparison of the print quality of normal commercially-available toners with different "amino acid toners":

The different toners were poured into a toner cassette and printed onto normal paper with a laser printer. The colouring of the "amino acid toners" comes about due to the magnetite particles contained therein.

Figure 10b

Commercially available laser printers have a resolution of 600 dpi, i.e. the individual dots that these devices print have a diameter of about 40 µm. Commercially available scanners with 4,800 dpi scan the object with about 5 µm steps. Scanning the scanned-in laser-printed image at high magnification typically shows no single wrongly placed pixel.

Figure 11

Paper is derivatised with a first layer of fmoc protected amino acids, non-linked fmoc amino acids are washed away and the fmoc protective groups of the first layer are cleaved with base. The free amino groups shown green in Figure 11A are formed.

A second layer of fmoc protected amino acids is imprinted at defined sites and links to the free amino groups shown green. The non-linked fmoc amino acids are then washed away and the remaining free amino groups are esterified with acetic acid anhydride.

Then the fmoc protective groups of the printed-on second layer are cleaved and the newly formed free amino groups are detected with bromophenol blue.

The resulting blue pattern reflects the sites at which the second layer of amino acids was imprinted.

Figure 12

Lysine followed by asparaginic acid is successively uniformly linked to the free amino groups of derivatised paper. Then two different peptides are synthesised in a chequered fashion on a support of derivatised paper. As described above, the amino acids shown in colour in Figure 12 corresponding to "amino acid toner" are produced. The amino acids marked with a coloured circle in Figure 12 are imprinted in a regular pattern of ovals whilst the amino acids marked with a coloured rectangle are printed as a second pattern of regularly arranged rectangles. Both patterns intermesh in a chequered fashion. The N-terminal amino acid asparaginic acid is then again uniformly linked to the carrier in a last step followed by cleaving of the protective groups.

Figure 13

The synthesis sites of the peptides shown in (A) correspond to the grey ovals or rectangles visible in (B). The paper strips are blocked with milk powder in PBS and incubated with anti-FLAG M1 antibody or with an anti-actin antibody. The bound first antibody is detected with peroxidase conjugated goat anti-mouse antibody (red substrate) or with alkali phosphatase conjugated goat anti-mouse antibody (blue substrate).

Figure 14

Characteristics of a laser printer.

Figure 15

Functional principle of a colour laser printer:

As in a black and white laser printer (Figure 5), the toner particles in a colour laser printer consist of small polystyrene beads with a magnetic fraction. They adhere to a magnetic roller as a result of the magnetic fraction and from there jump onto the selenium roller written by the laser beam as a result of electrical attraction forces. From there the toner particles jump onto paper or a copying film and are fused by a hot roller.

Unlike the black and white laser printer, a colour laser printer must not only imprint a toner but print four different-coloured toner particles exactly adjacent to one another. The diagram shows schematically how this problem is solved:

- The selenium roller is substantially larger than in the black and white laser printer
- Thus the laser can "write" a whole page onto this roller
- The laser "writes" the selenium roller with the first colour
- A magnetic roller carrying the first colour toner approaches the selenium roller
- From there the toner particles jump onto the "written" selenium roller
- The selenium roller is closely coupled to a second roller of the same size
- A sheet of paper is drawn onto this roller and fixed there
- The two rollers rotate with respect to one another

- The first toner is thus transferred to the paper, which remains fixed
- The laser "writes" the selenium with the second colour
- Other interchangeable magnetic rollers then approach the selenium roller
- Which transfer the other colours to the selenium roller and from there to the paper
- Only when the entire printing process is completed, is the paper released.

Figure 15b

Device for combinatorial synthesis:

Unlike Figure 15, in this figure the hot roller (No. 6) has been replaced by an apparatus which can bring linking reagents or washing solutions in the gaseous or liquid state in contact with the rotating "support roller". Gaseous substances are supplied with the aid of a broad nozzle (not shown) whilst liquids are brought in contact with the molecule library support fixed on the "support roller". The interchangeable magnetic roller with the four different coloured toners is exchanged for an interchangeable magnetic roller with 20 different "amino acid toners".

Figure 16

Electronically re-adjustable colour laser printer:

A scanner unit scans a pattern applied to the support and compares it with the same already-stored pattern. If a deviation from the desired value is established, the image loaded into the printer memory is shifted electronically by this deviation.

Figure 18

If normal fmoc-protected amino acids with a free carboxy terminus are brought onto a support, these must then be activated by an activator and a base. A reactive ester is then formed (see also Figure 6, No. 2) which immediately reacts with the free amino groups of the support. However, if the activator is present in excess, there is also an undesirable side reaction: the activator additionally links directly to the available free amino groups of the support, the number of available free amino groups decreasing with each synthesis cycle. If, on the other hand pre-activated amino acids are printed, the risk of this side reaction is avoided. The figure also shows as an example of such pre-activation, an amino acid anhydride whereby the linking efficiencies are significantly increased.

Figure 19A + 19B

Method for combinatorial synthesis

In the commonly used lithographic synthesis methods, the synthesis site is made accessible for the activated monomers as a result of the action of light (Fig. 19A) or light-sensitive protective groups are cleaved (Fig. 19B) whereby a locally-definable chain lengthening is made possible. An advantage of both methods is their high resolution. A disadvantage of both methods is that the entire synthesis cycle must be run through successively for each individual monomer, which is at the cost of quality.

Figure 19C + 19D

Figure 19D describes the spotting (or printing with an ink-jet printer) of monomers on a support. An advantage of this method is a complete layer of different monomers can be applied to the support in parallel and each type of monomer need not be linked separately. A disadvantage of this method is the relatively poor resolution. The method presented above in the text is shown in Figure 19C. It combines the advantages of the other methods. Here, as in the lithographic methods, the high resolution of laser

light is used to obtain a closely-packed molecule library. On the other hand a complete layer of different monomers can thereby be applied to the support in parallel.

Figure 20

Disadvantages of the spotting of monomers

If paper is printed with ink, the printed chromophores must diffuse as little as possible since this would disturb the brilliance of the printed image. This is achieved by fixing the applied chromophores very rapidly in place as a result of the highly-volatile components in the toner fluids used. In addition, the chromophores used are relatively large, which appreciably restricts their diffusion rate. In addition, special highly-absorbent high-gloss papers are used. The applied monomers (for a combinatorial synthesis) will, however diffuse very much further since the solvent used for the synthesis is very poorly volatile since time is taken for linking the reaction partners. In addition, the monomers used are comparatively small which appreciably increases their diffusion rate. Special papers are not normally suitable as supports of a molecule library.

Figure 21

In all printing methods an entire layer of different monomers is always applied to the support which then all together run through a linking cycle before the next layer of monomers is imprinted. In the lithographic synthesis technique show in Figure 19A & 19B, on the other hand, each type of monomer must be successively applied individually, linked and excess monomers washed away. This means that for the synthesis of the same array of oligomers, the lithographic synthesis methods must run through N times more linking cycles than are required in the printing method (Figure 19C & 19D). The number N stands for the number of different monomers, i.e. for the synthesis of an array of oligopeptides the lithographic syntheses require 20x more linking cycles compared with the printing method.

Figure 22

Confocal laser microscope

Affymetrix scans its arrays with the aid of a confocal laser microscope. In this case, however, all three dimensions of the space must be scanned until the desired signal can be unambiguously identified. Compared to this, a scanner is much faster:

1. It not merely has one laser available but works in parallel with an array of light-emitting diodes.
2. Since the light of the light-emitting diodes transilluminates the support almost parallel, the searching in the third spatial dimension is omitted in the scanner.

Figure 23

The about 100,000 genes of a human on average, encode somewhat less than 500 amino acids per gene. In a few years, over 90% of these genes will be known. Each of these gene products can be represented by an average of 100 overlapping 15er peptides which are mutually shifted by 5 amino acids. Overall then, about 10 million different peptides are required to cover the entire human genome.

Figure 23x

Examples of applications for the array of gene products described in Figure 23.

Figure 24

"Complete" peptide libraries

Arrays of the decamer mixtures shown can be synthesised on a support using the method described further above. In this case, all feasible combination of amino acids designated with N are covered.

Figure 25

Correlation of disease with peptide pattern

The differential staining of a highly complex array of peptides with control serum and with serum from patients makes it possible to identify patient-specific staining patterns. Thus, several diseases can be diagnosed in parallel or conversely hitherto unknown causes of disease can be tracked using the peptides detected. In the given example, peptides are identified which correspond to the expressed gene products of *Helicobacter pylori*, which causes gastric ulcers.

Figure 25x

Applications for the array of a penta or hexapeptide library.

Figure 26

Search for enzyme inhibitors

Two different enzyme detections allow the differential identification of peptides which bind the enzyme but simultaneously block its enzyme activity. These modules of D-peptides are suitable as building blocks for potential therapeutic substances.

PATENT CLAIMS

1. Methods and apparatus for the application of substances, in particular of molecules, to a support, characterised in
 - that an immobilised substance is made mobile by changing the physical environment, in particular the matrix layer,
 - that the substance thus made mobile is brought into the vicinity of the support, in particular the support surface, by a physical process,
 - that the substance thus made mobile binds to molecules or atoms located on the support or forms an aggregate or undergoes a chemical reaction with these,
 - that the substances thus made mobile are or give many different substances.
2. The method and apparatus according to claim 1, wherein the substance specified in claim 1 is immobilised in particles.
3. The method and apparatus according to claim 1 and 2, wherein the particles specified in claim 2 are brought into the vicinity of a support in a locally precise manner as a result of physical processes.
4. The method and apparatus according to claim 1 to 3, wherein the locally precise transfer of the particles according to claim 3 is carried out with the aid of a laser printer, in particular a colour laser printer.

5. The method and apparatus according to claim 4, wherein the toner particles of a laser printer, in particular a colour laser printer are replaced by the particles specified in claim 2.
6. The method and apparatus according to claim 1 to 5, wherein in a repetitive process the said particles are repeatedly applied to the support in a locally precise manner, in each case followed by the making mobile the immobilised substance described in claim 1.
7. The method and apparatus according to claim 6, wherein the support remains fixed during the entire repetitive process.

ABSTRACT

Methods and apparatus for the rapid detection of optical properties, in particular luminescence reactions and refraction behaviour, of molecules bound on a support, in particular biological molecules

It is the object of the invention to provide improved methods and apparatus for detecting optical properties, in particular of luminescence reactions and refraction behaviour of molecules bound on a support, in particular biological molecules, which in addition are fast and can be produced or carried out cost-effectively.

Various methods and apparatus are provided for solving this object, wherein inter alia a commercially available CD (12) is used as a support for the molecules (14) to be studied and the signal-to-noise ratio in the luminescence reactions is improved by exciting light (26) no longer being able to reach a detector (28) which detects emitted light (32).

One of the methods requires no parts moving relative to one another for the lithographic synthesis and readout of binding events to the molecule library applied to the support, with the result that synthesis accuracy, readout accuracy and readout speed can be significantly improved due to the compact design.

Combinatorial Synthesis

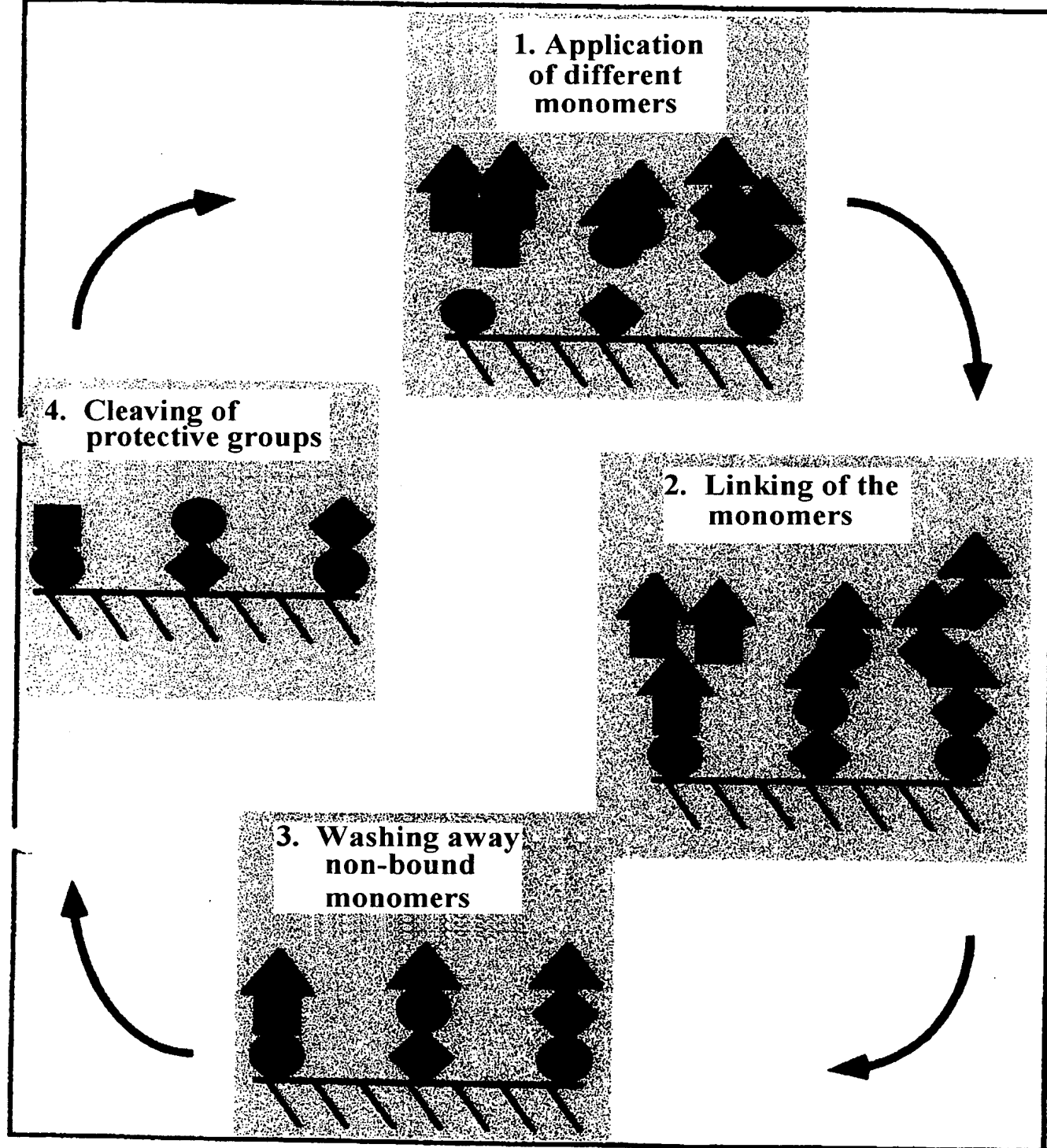
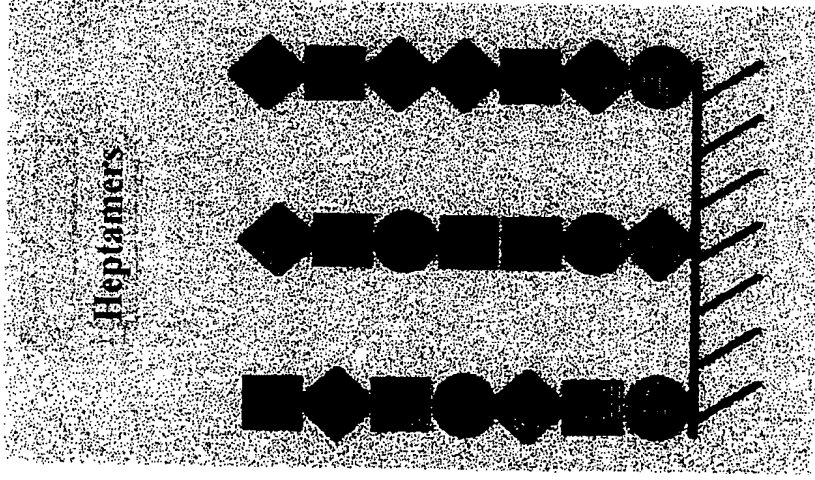


Fig. 3

Complexity of combinatorial peptide libraries



$20^1 = 20$ different amino acids

$20^2 = 400$ different dipeptides

$20^3 = 8,000$ different tripeptides

$20^4 = 160,000$ different tetrapeptides

$20^5 = 3.2$ million different pentapeptides

$20^6 = 64$ million different hexapeptides

$20^7 = 1,280$ million different heptapeptides

Fig. 4

Functional principle of a laser printer

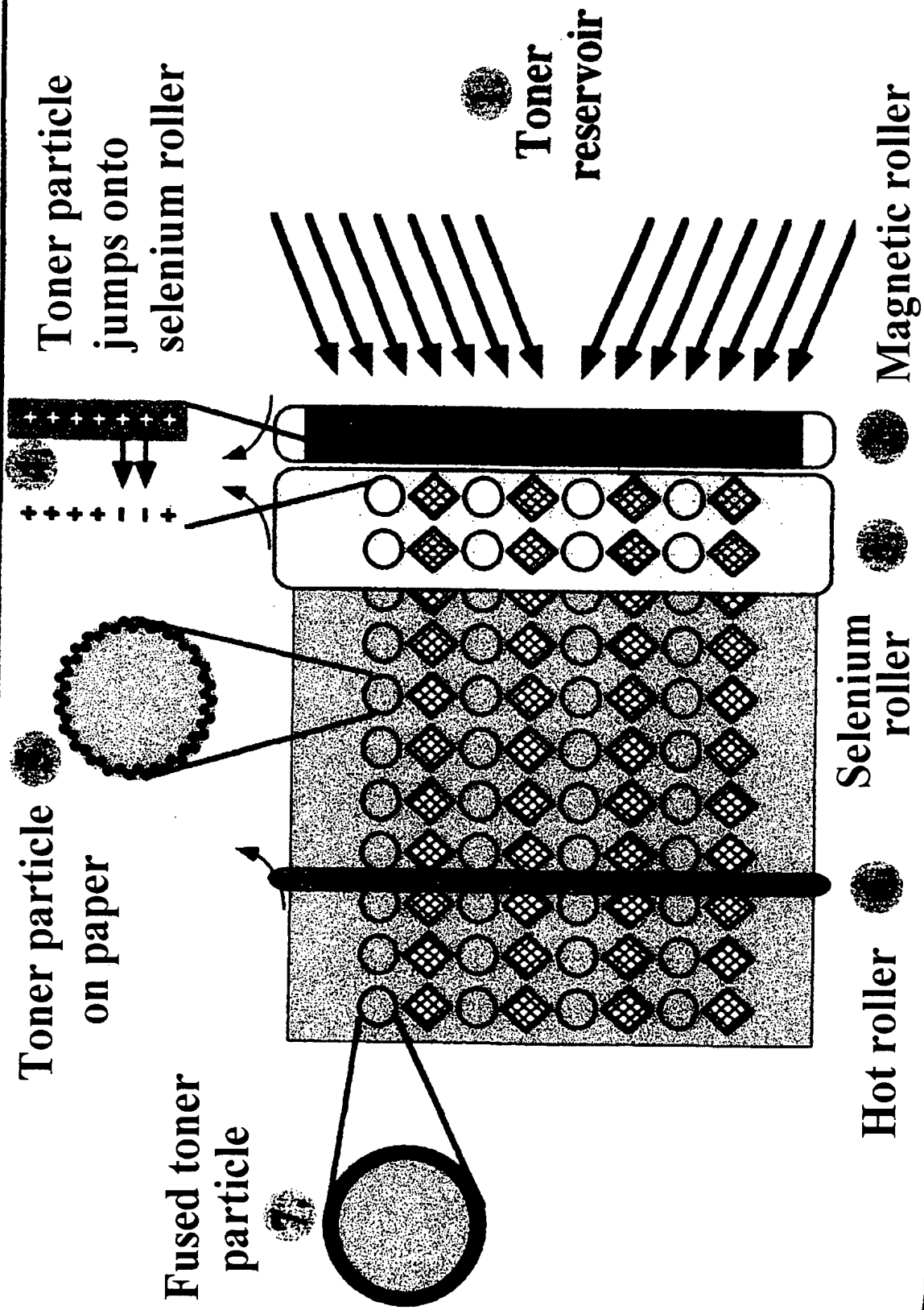


Fig. 5

Derivatised paper as support for peptide synthesis

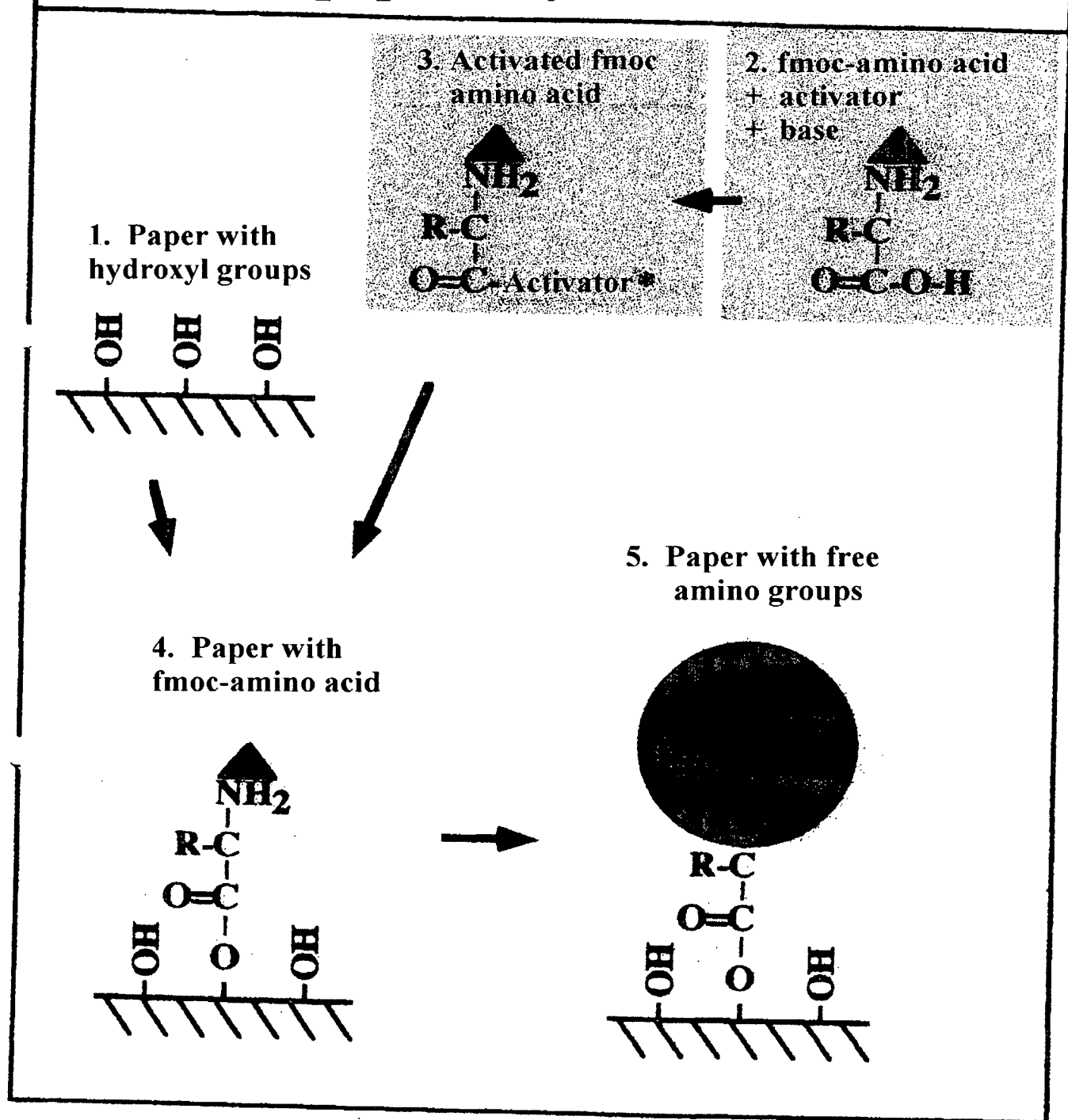
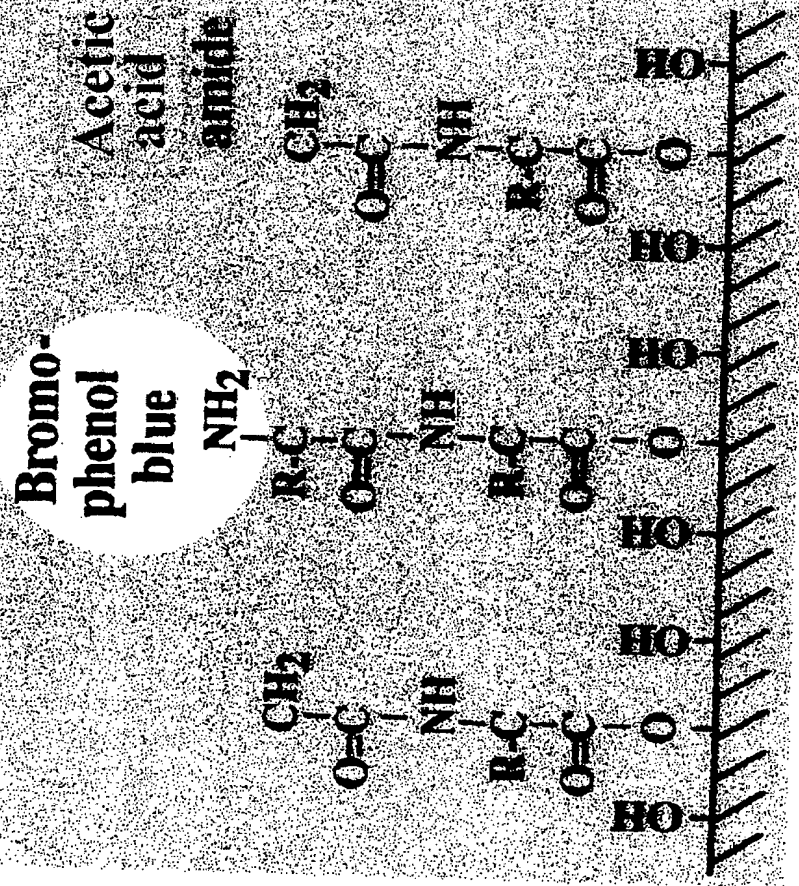


Fig. 6

Detection of free amino groups using bromophenol blue

A SPOTs with free amino groups



B SPOTs

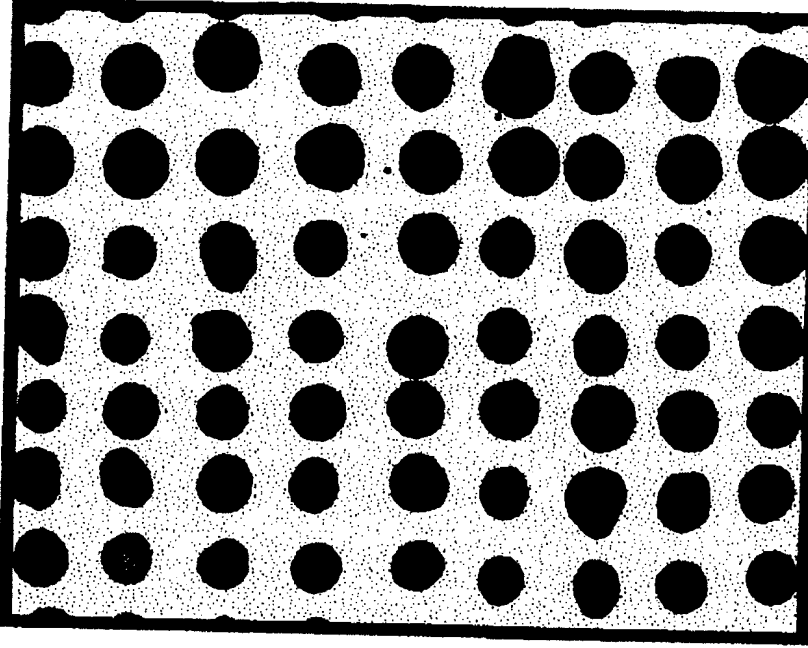
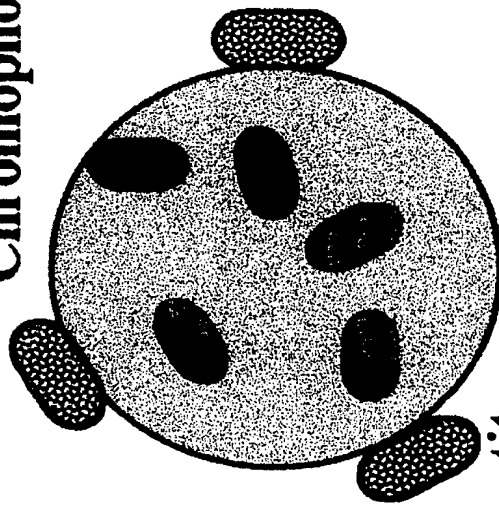


Fig. 7

Amino acid toner particle

**Normal
toner particle**

Chromophors

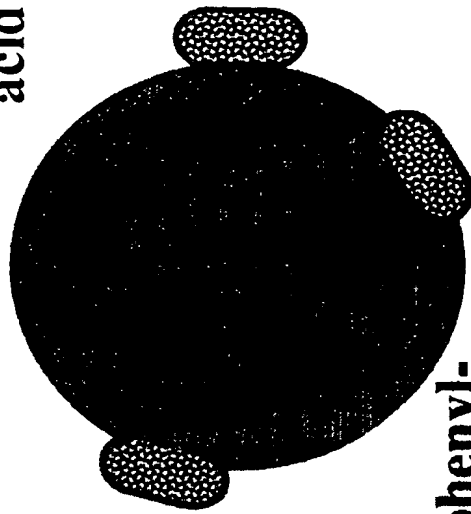


Magnetite

Polystyrene

**Amino acid
toner particle**

**fmoc
amino
acid**



**Diphenyl-
formamide**

Magnetite

Fig. 8

Linking to the support functions in the presence of diphenylformamide (DMF)

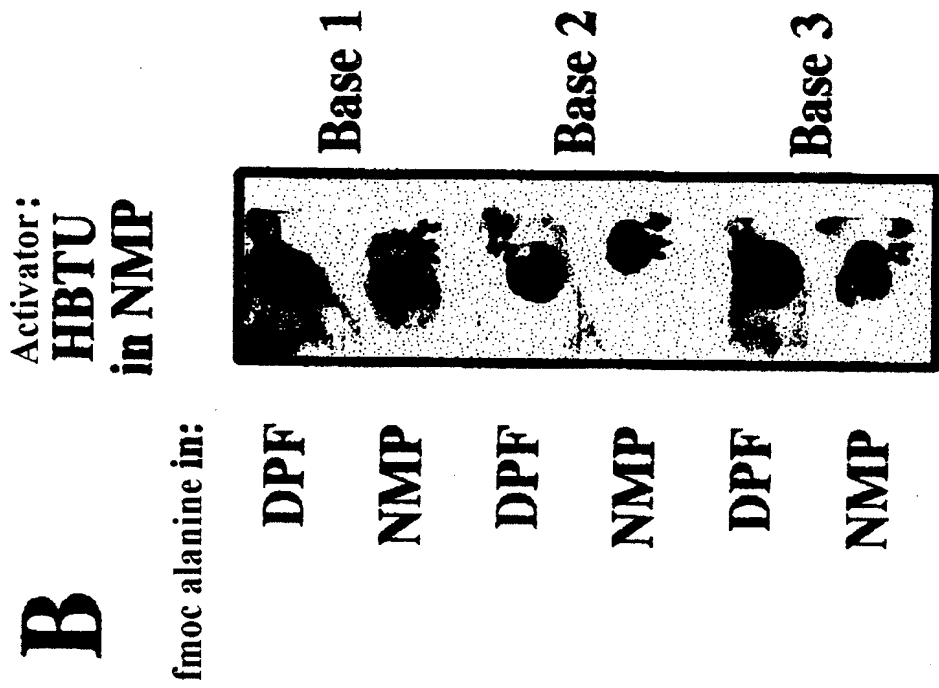
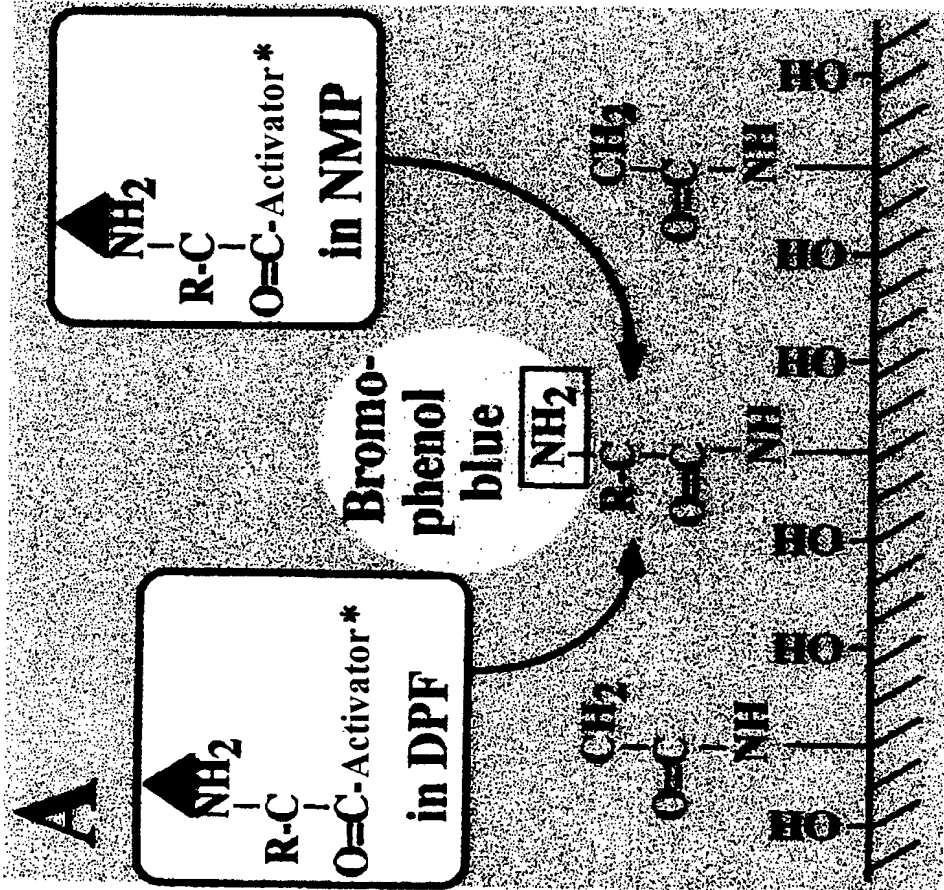


Fig. 9

Amino acids with protective groups can be printed using a laser printer

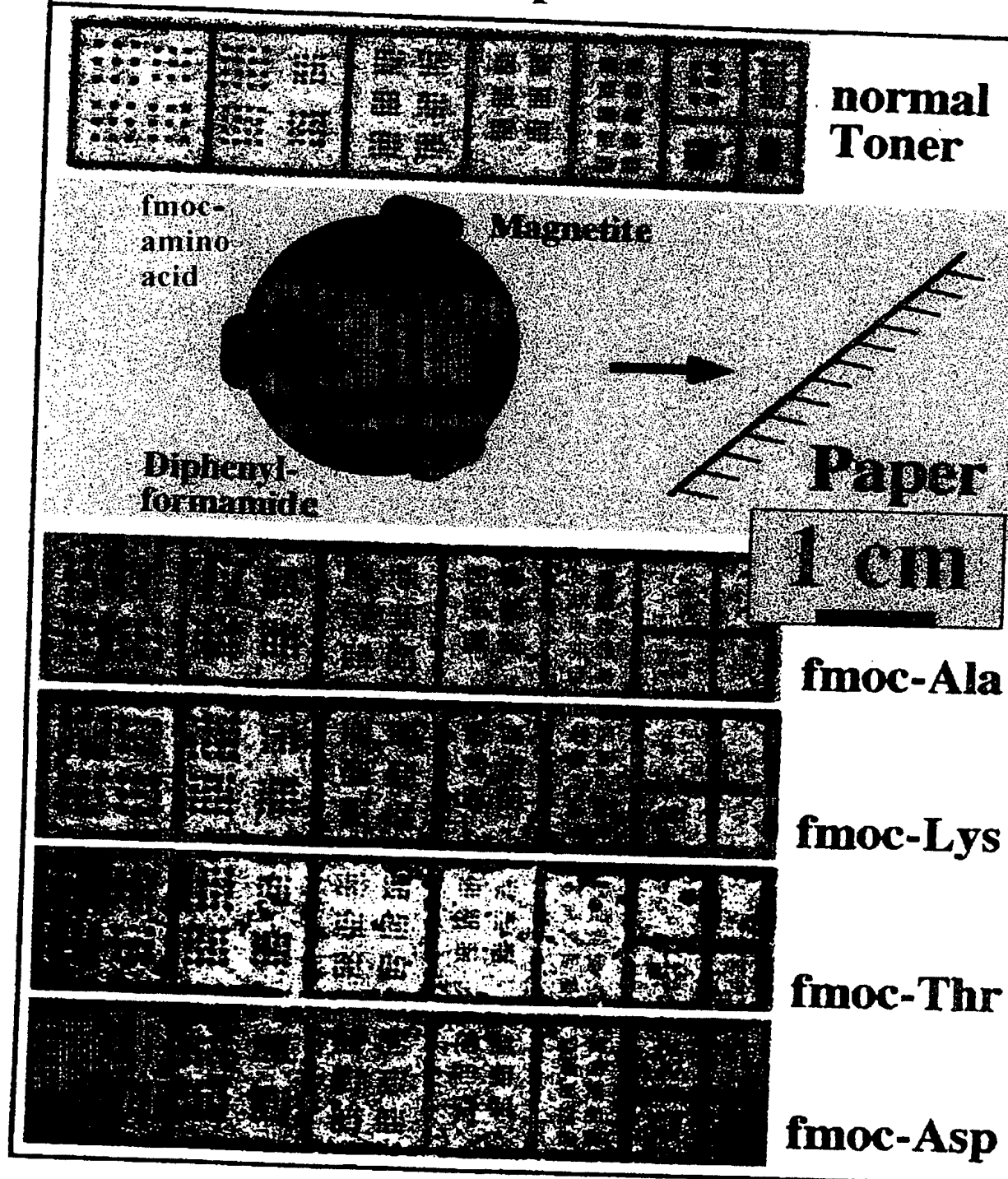
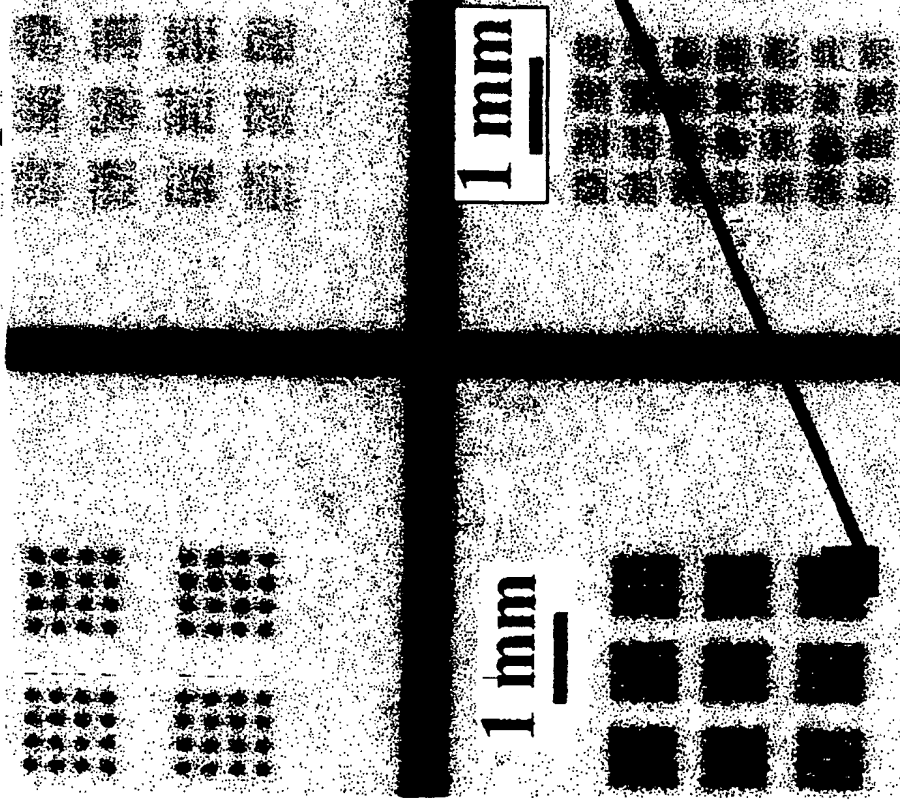


Fig. 10

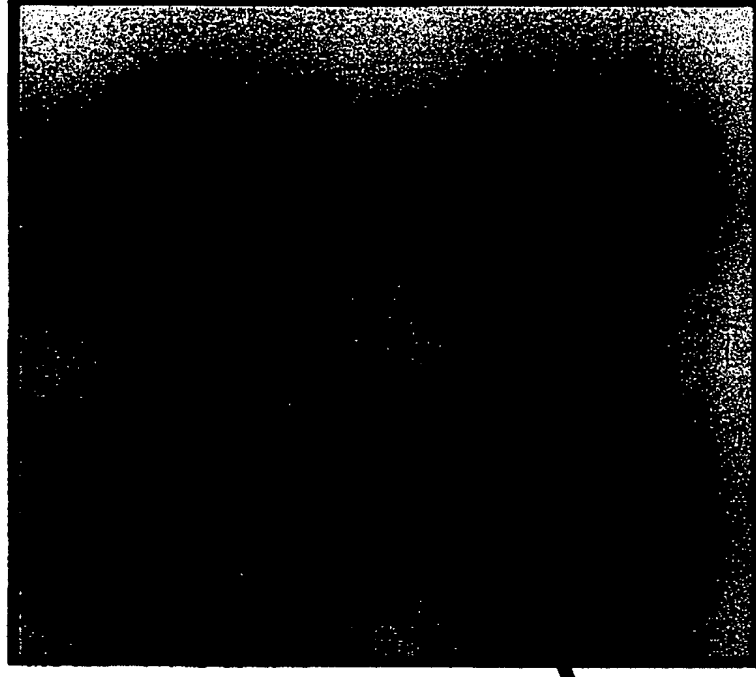
Resolution of commercially available equipment:

Laser printer at 600 dpi



Normal toner

Scanner at 4,800 dpi



50 μm

Normal toner

Fig. 10b

Synthesis of two peptides using a laser printer

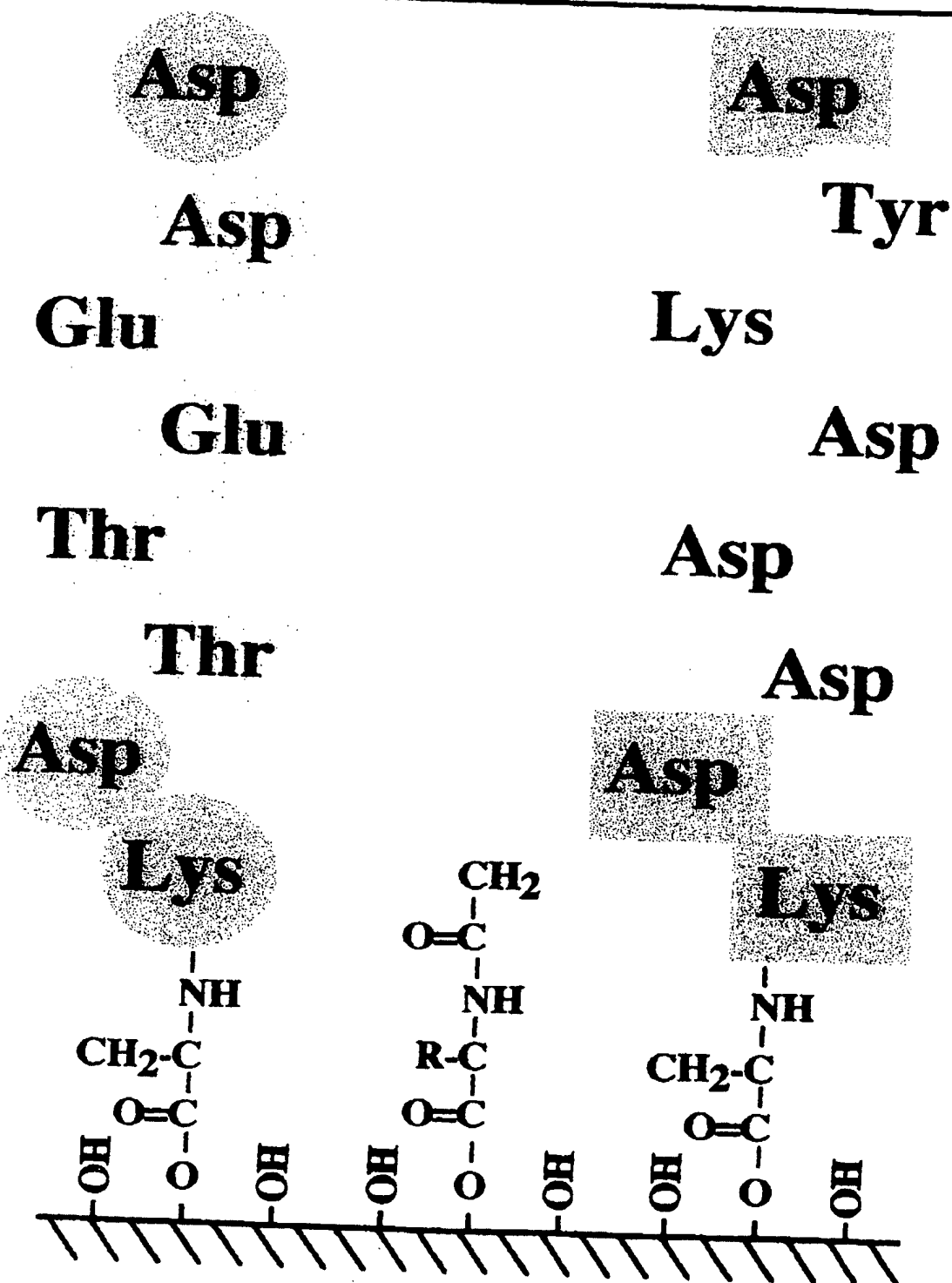


Fig. 12

Peptides synthesised using a laser printer are recognised by a monoclonal antibody

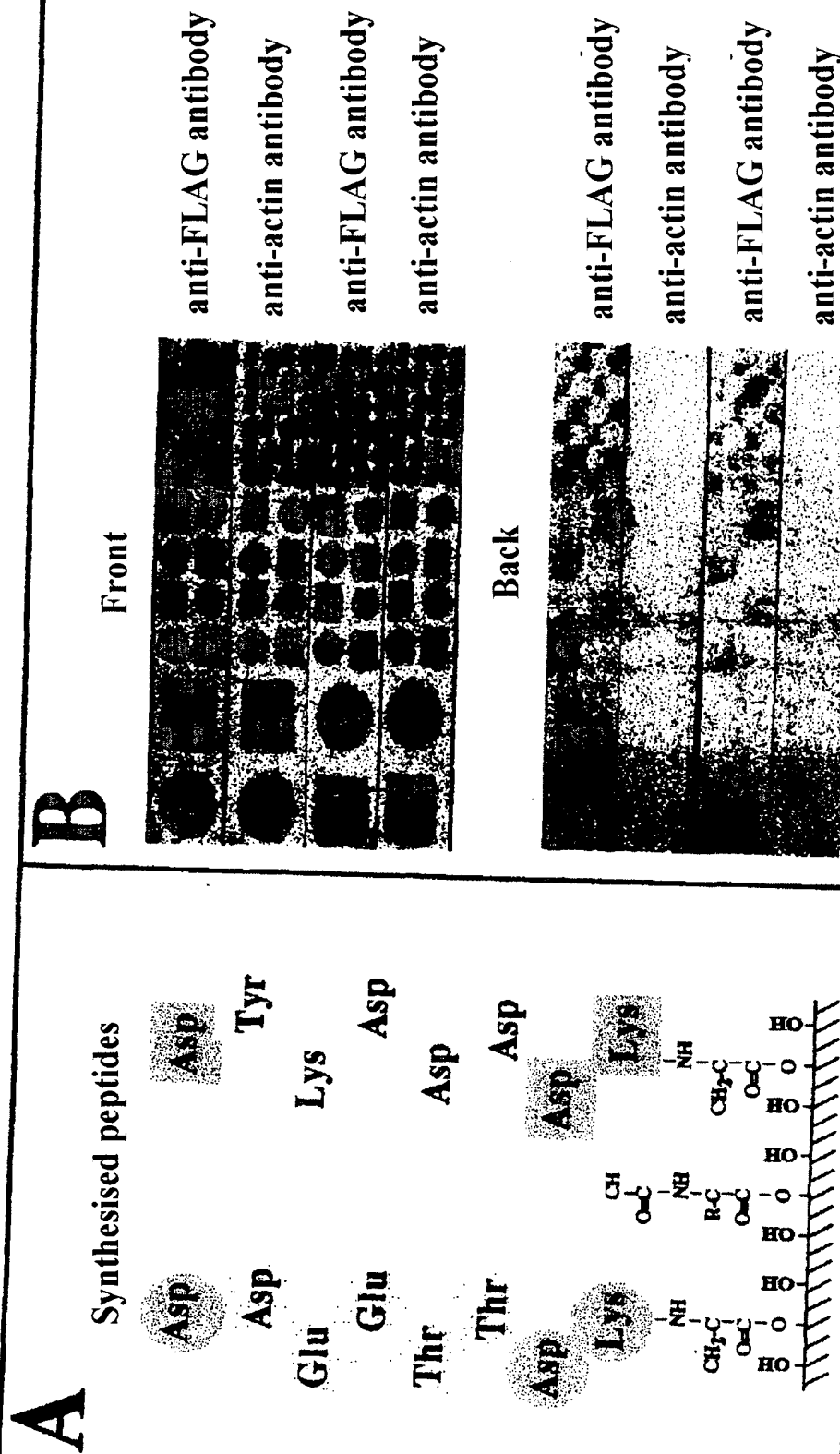
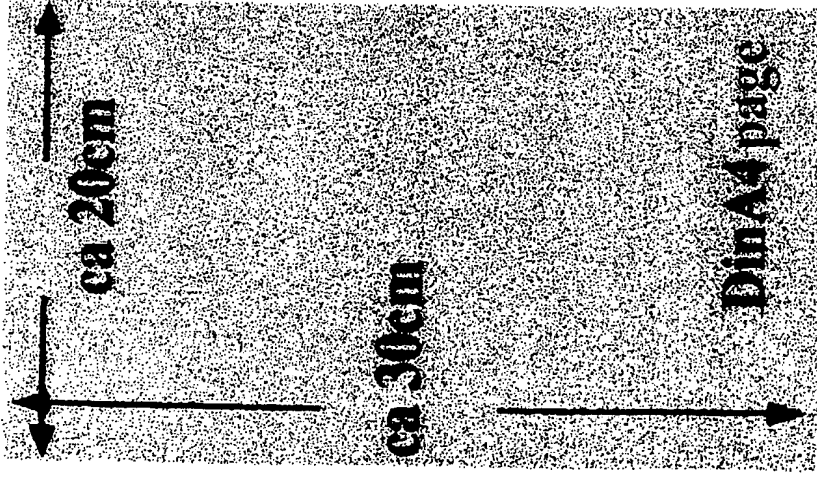


Fig. 13

Characteristics of a laser printer



600 dpi = 600 dots per inch

600 dpi = ca 1 dot every 40 μm

1,200 dpi = ca 1 dot every 20 μm

2,400 dpi = ca 1 dot every 10 μm

4,800 dpi = ca 1 dot every 5 μm

Dots per Din A4 page

600 dpi = ca 5 000 x 7,500 = ca 30 million dots

1,200 dpi = ca 10,000 x 15,000 = ca 125 million dots

2,400 dpi = ca 20,000 x 30,000 = ca 500 million dots

4,800 dpi = ca 40,000 x 60,000 = ca 2,000 million dots

Fig. 14

Functional principle of the colour laser printer

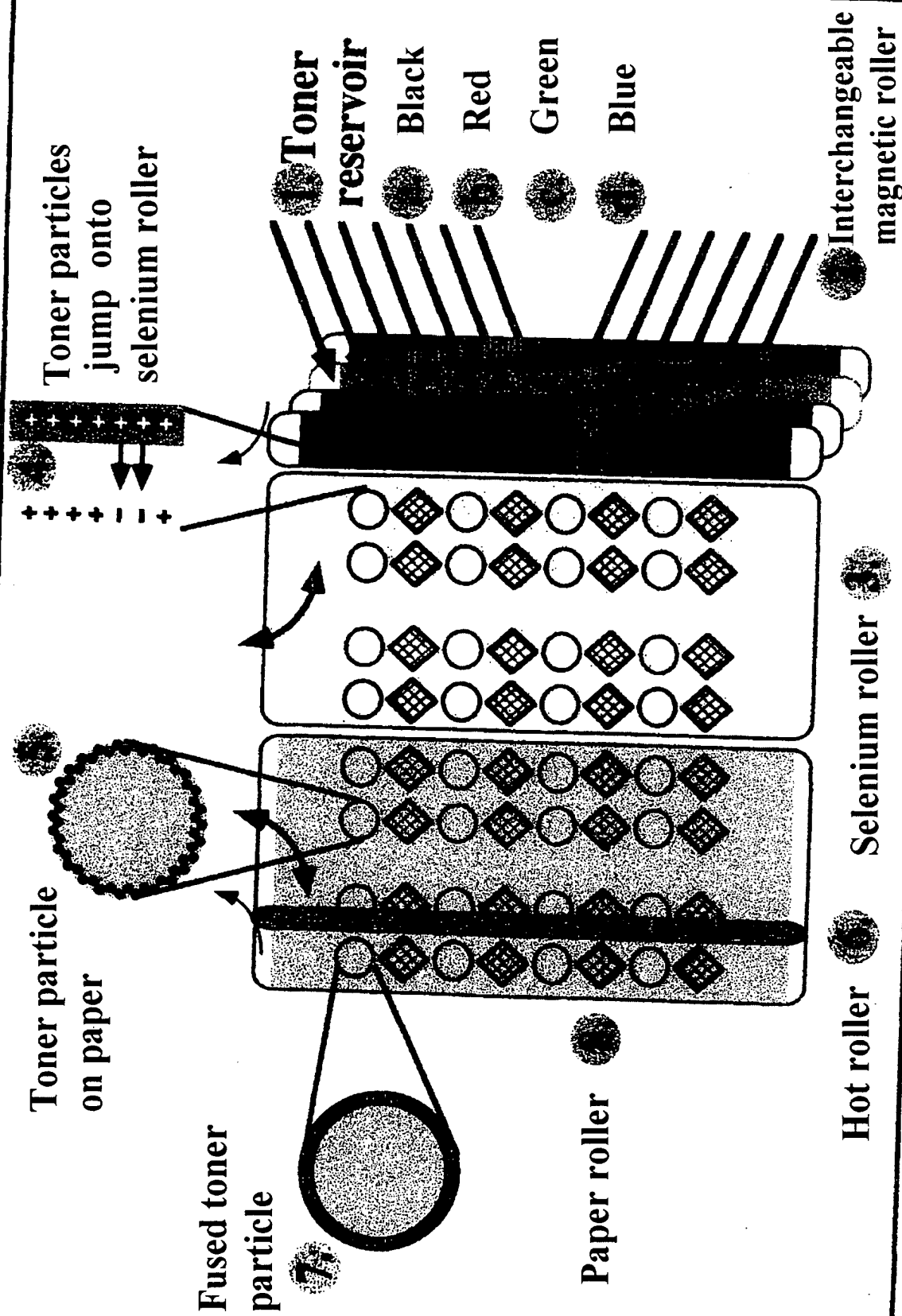


Fig. 15

Peptide synthesis using a colour laser printer

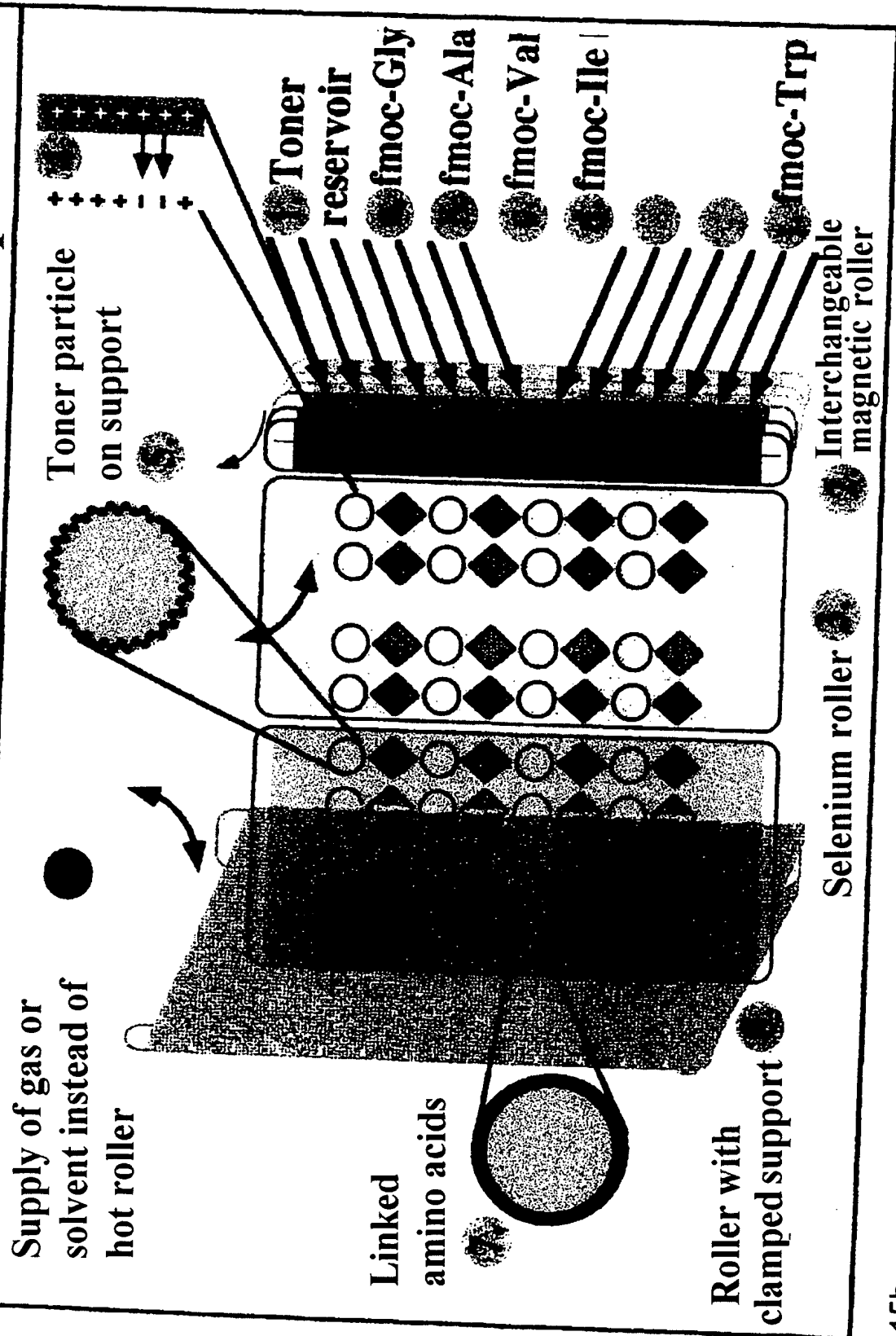


Fig. 15b

Readjustment using a scanner

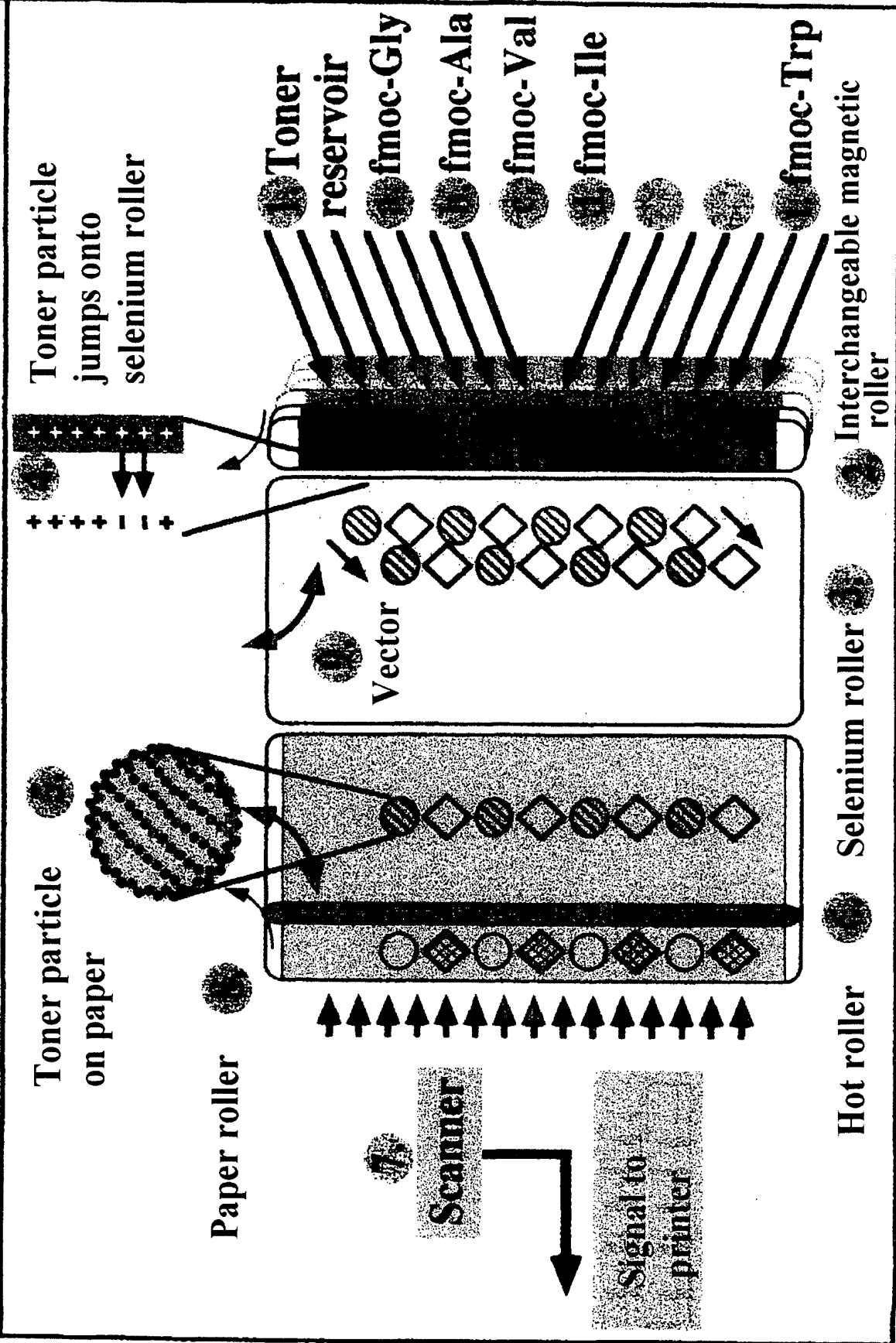


Fig. 16

The anhydrides of fmoc amino acids give better linking coefficients

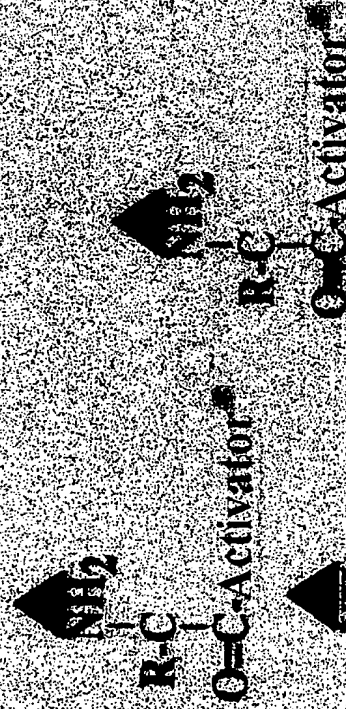
Derivatised paper with free

amino groups

+ fmoc amino acid

+ activator

+ base



Derivatised paper with free

amino groups

+ fmoc amino acid anhydride

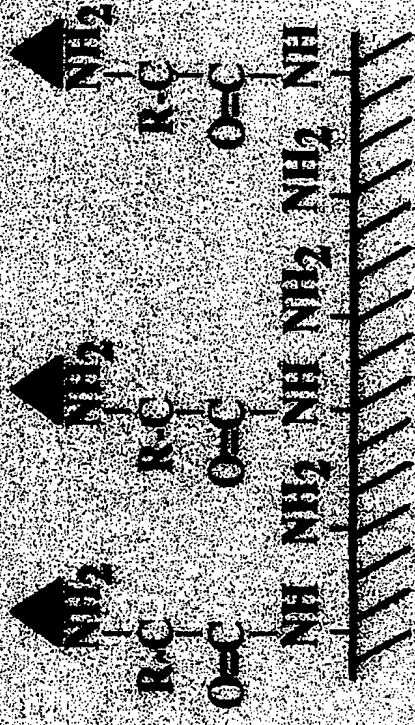
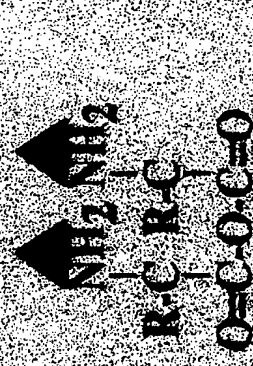
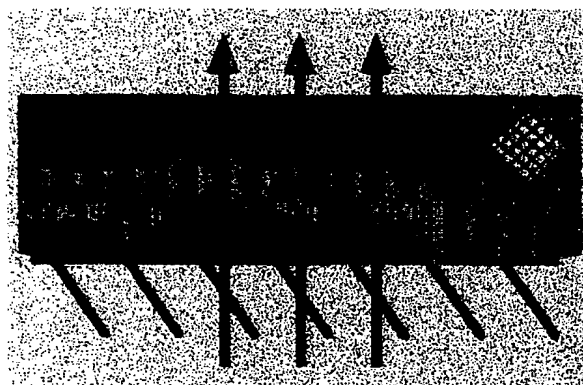
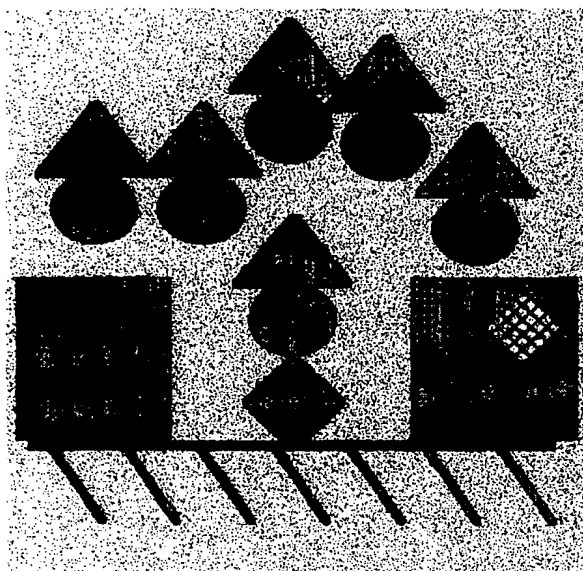


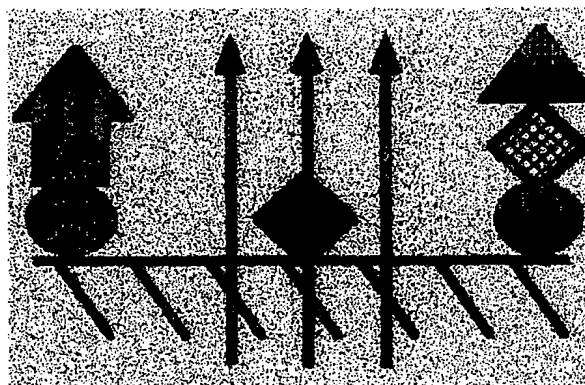
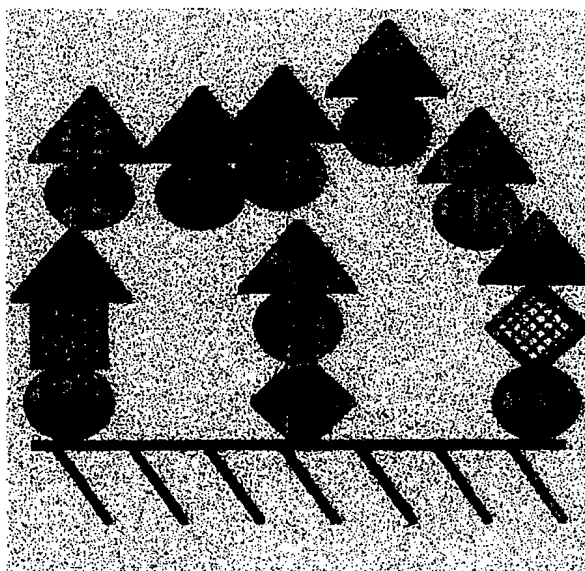
Fig. 18

Lithographic synthesis methods

A Access to synthesis site by light



B Cleaving of protective groups by light



Advantages:
unrivalled high resolution

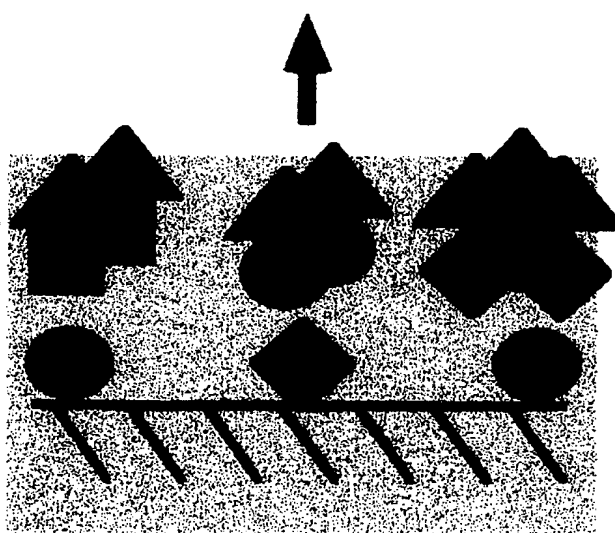
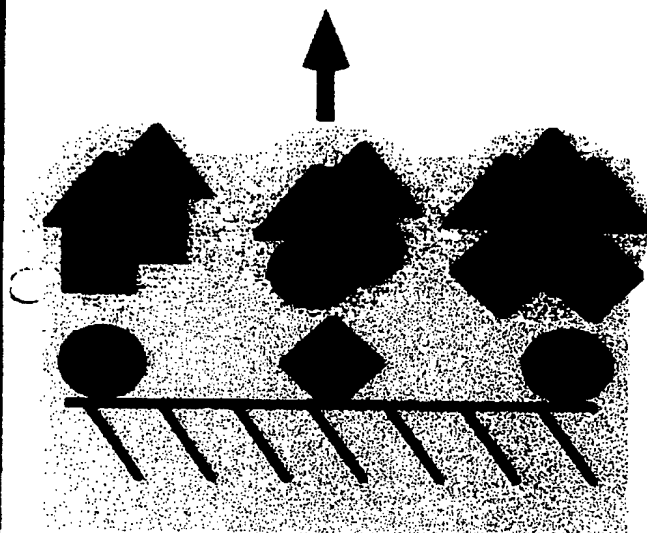
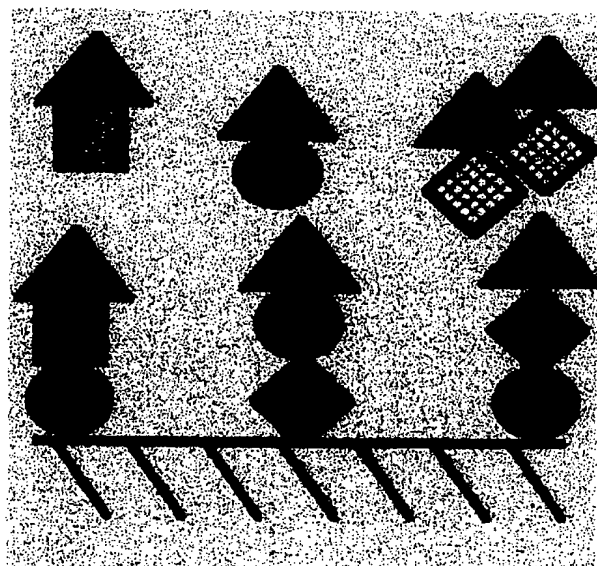
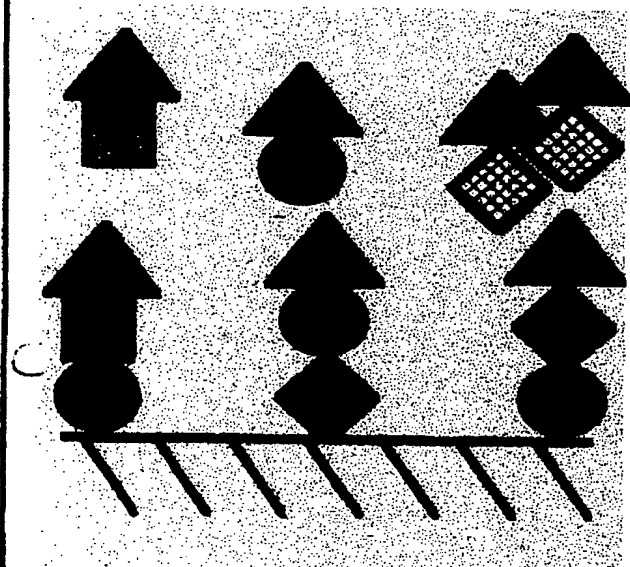
Disadvantages:
in each layer all the monomers must be successively linked to the support

Fig. 19A + 19B

Combinatorial synthesis methods

C Imprinting
with a
laser printer

D Spotting or
ink jet printer



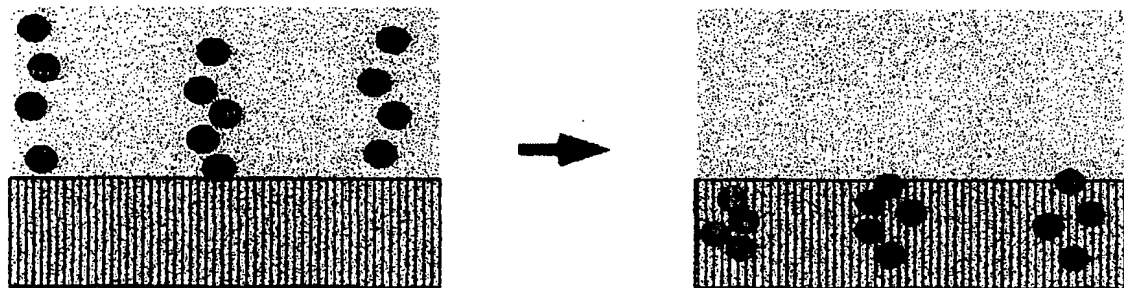
Advantages:
parallel application of all the monomers

Disadvantages:
running/evaporation of solvent
undesirable diffusion of monomers
poor resolution

Fig. 19C + 19D

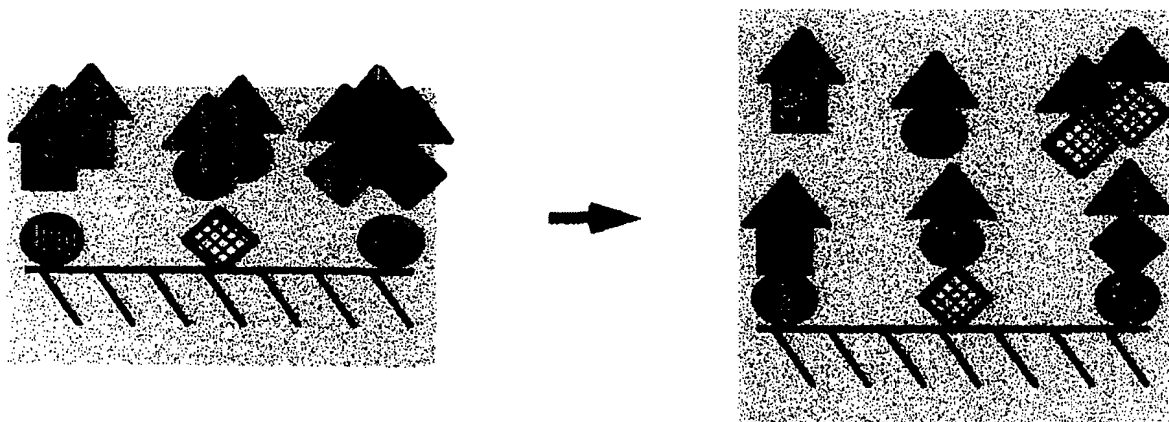
Disadvantages of the spotting of monomers

Requirements for the spotting of ink:



- Low diffusion rate of large chromophores
- Rapidly evaporating solvent
- Absorbent paper

Requirements for the spotting of monomers for combinatorial syntheses:



- High diffusion rate of small monomers
- Very slowly evaporating solvent
- Support with the smoothest possible surface

Fig. 20

Disadvantages of lithographic syntheses

1 X

N X

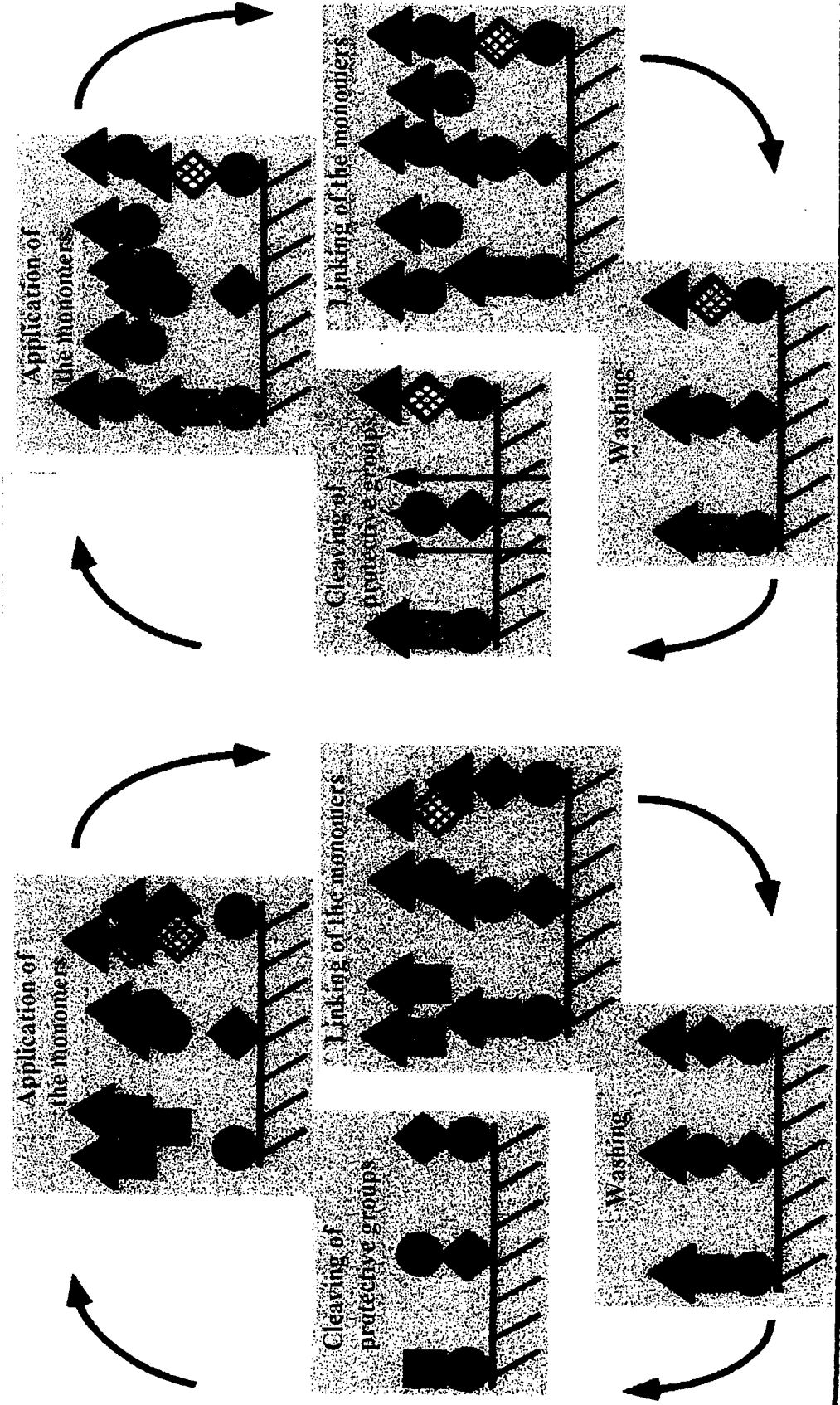


Fig. 21

Confocal laser for reading out fluorescence signals

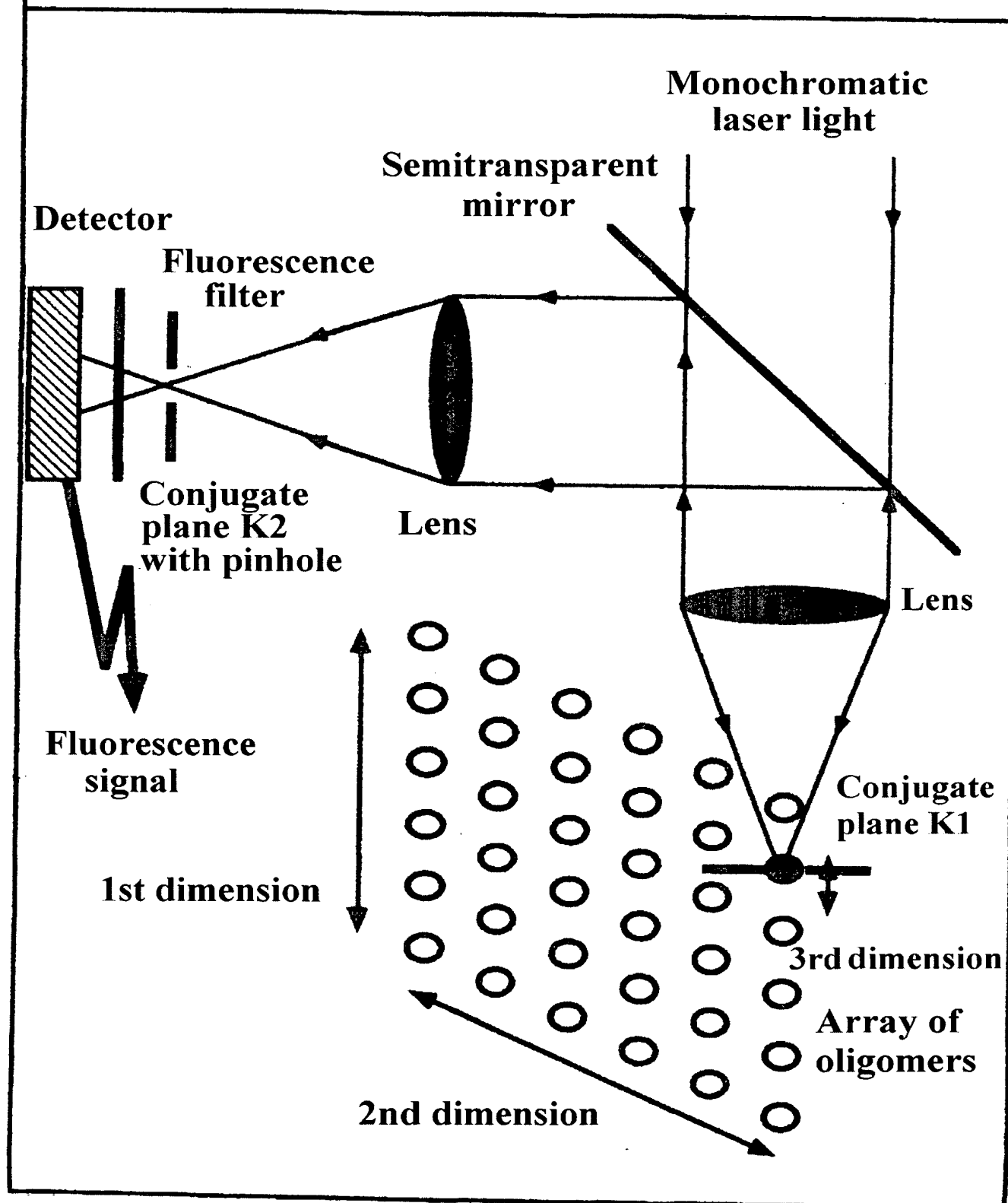


Fig. 22

Array of gene products

An average human gene encodes about 500 amino acids



15 AA



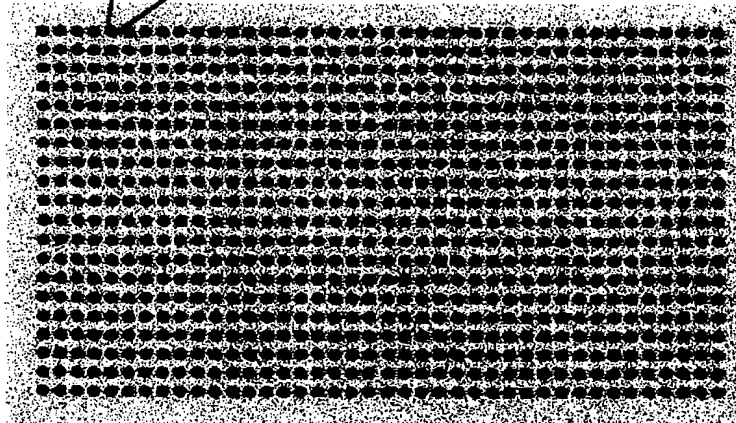
Gene 1

Gene 2

Gene 3

Gene 4

Gene 5



Peptides required per gene (ca 500 AA):
= ca 100 x 15mer (offset every 5 AA)

Number of human genes:
= ca 100,000

Peptides required to cover all genes:
= 100 x 100,000 = ca 10 million

Fig. 23

Applications for the array of gene products

1. Epitope determination of monoclonal antibodies
2. Serum profile of autoimmune patients
3. Serum profile of patients having diseases of unknown cause
4. Serum profile of cancer patients
5. Search for interaction partners
 - a. of human gene products
 - b. of pathogens (e.g. of viral gene products)

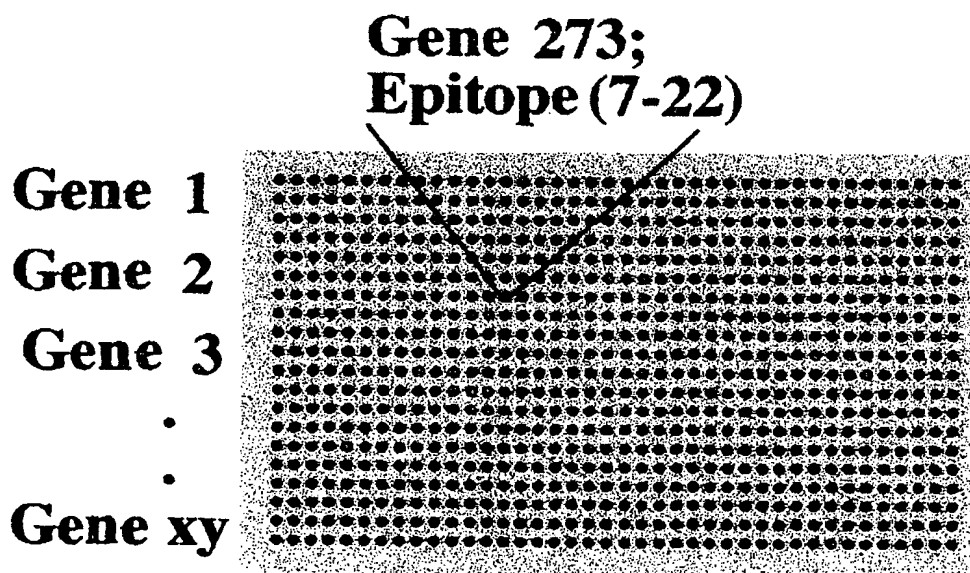


Fig. 23x

Complete peptide libraries

Synthesis of decamer mixtures with fixed amino acid positions

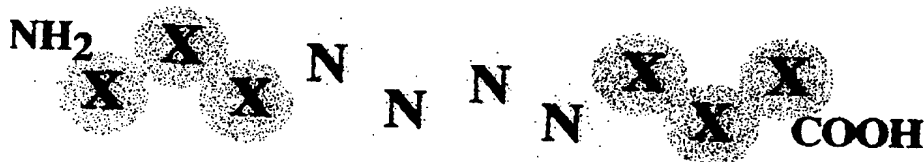
N = Fixed position

X = Mixture of amino acids



complete tripeptide library:

$$= 20^3 = 8,000 \text{ different peptides}$$



complete tetrapeptide library:

$$= 20^4 = 160,000 \text{ different peptides}$$



complete pentapeptide library:

$$= 20^5 = 3.2 \text{ million different peptides}$$



complete hexapeptide library:

$$= 20^6 = 64 \text{ million different peptides}$$

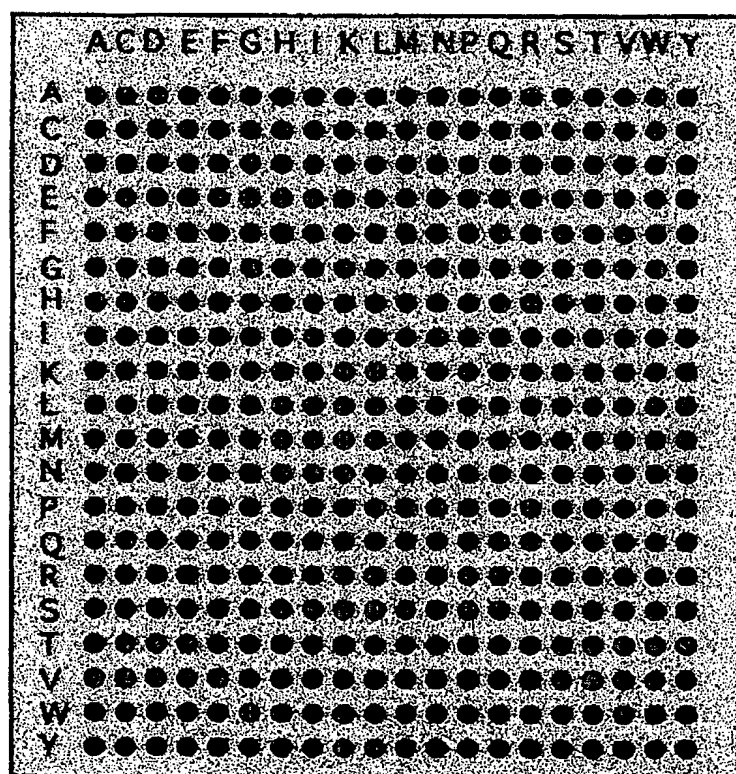
Fig. 24

Correlation of disease with peptide pattern

Staining of a complete pentamer library with serum:

a. Control sera

b. Patients with gastric ulcers



Blue colouration:
peptides recognised by all sera

Red colouration:
peptides only recognised by serum from patients
with gastric ulcers

Fig. 25

Applications for the array of a penta or hexamer library

1. Epitope determination of monoclonal antibodies
2. Finding diagnostic markers by correlation of the serum profile with the diagnosed disease
3. Serum profile for parallel diagnosis of diseases
 - a. of autoimmune diseases
 - b. of infectious diseases
 - c. of cancerous diseases
 - d. of allergies
 - e. of diseases of unknown cause
4. Search for interaction partners
 - a. of human gene products
 - b. of pathogens (e.g. of viral gene products)

Epitope:
XXXAGNTSXXX

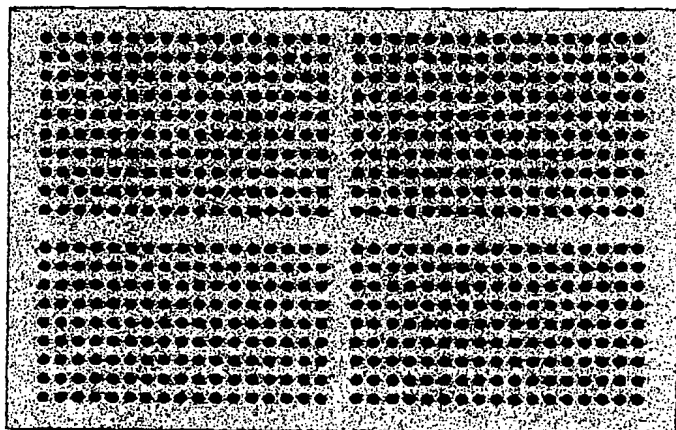


Fig. 25x

Search for enzyme inhibitors

The binding of a protease to a complete pentamer library of D-amino acids

Blue colouration:
peptides to which the protease can bind
(detected by a monoclonal antibody)

Green colouration:
Enzyme reaction of the bound protease with
colour labelled peptide substrate

Red colouration:
Bound protease with enzyme activity

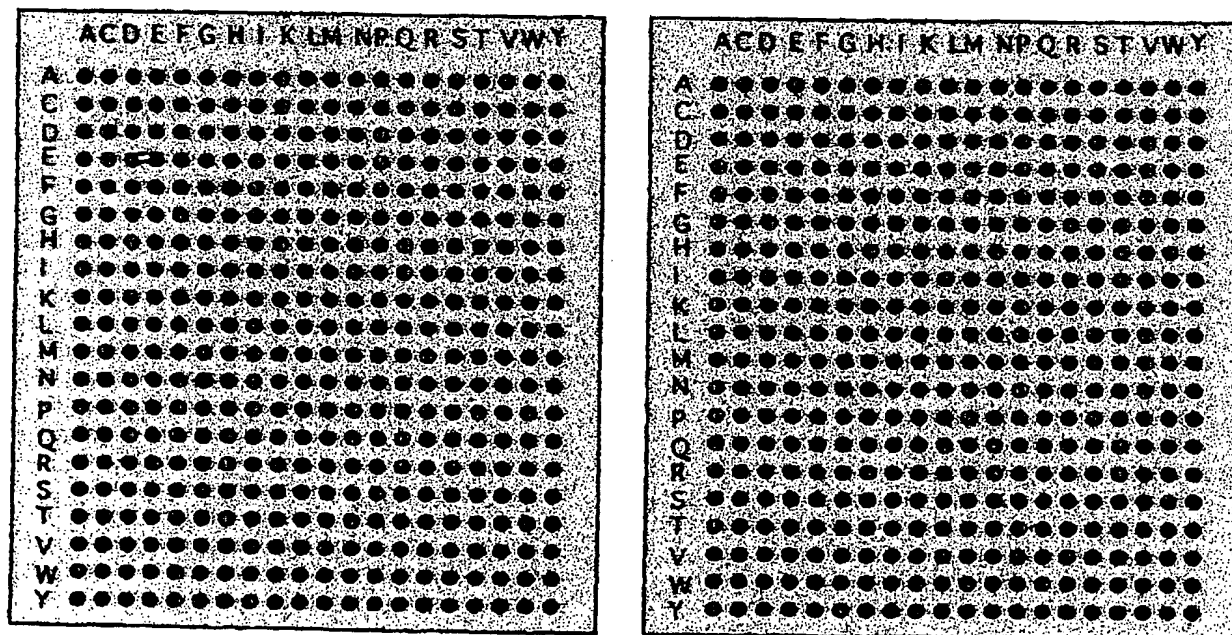
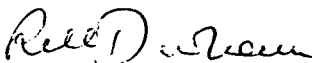


Fig. 26

CERTIFICATION OF TRANSLATION

I,.....Rosamund.....Durham.....c/o.....Technical.....Translation
.....Agency.....GmbH,.....Fasangarten 8.....A-2136.....Laa/Thaya
.....AUSTRIA.....am the
translator of the documents attaches and certify that the following is a true
translation to the best of my knowledge and belief.


Signature of translator

dated this 27th day of August 2010